



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Sciences et Génie des Matériaux*

Présentée et soutenue par *Patricia PASCAUD*
Le *28 Novembre 2012*

Titre : *Apatites nanocristallines biomimétiques comme modèles de la réactivité osseuse : Etude des propriétés d'adsorption et de l'activité cellulaire d'un bisphosphonate, le tiludronate*

JURY

Pr. Jean-Michel BOULER, Université de Nantes
Pr. Guillaume PENEL, Université de Lille
Pr. Adriana BIGI, Università di Bologna, Italia
Pr. Pascal SWIDER, Université de Toulouse
Pr. Christian REY, Université de Toulouse
Dr. Stéphanie SARDA, Université de Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Présidente
Examineur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Ecole doctorale : *Sciences de la Matière (SDM)*
Unité de recherche : *Institut Carnot CIRIMAT, INP-UPS-UMR CNRS 5085*
Directeur(s) de Thèse : *Pr. Christian REY et Dr. Stéphanie SARDA*
Rapporteurs : *Pr. Jean-Michel BOULER et Pr. Guillaume PENEL*

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce projet. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien.

Je tiens tout d'abord à adresser toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèses : *Christian Rey* et *Stéphanie Sarda*. Merci de vous être investi pleinement dans ce projet. J'ai énormément appris à vos côtés.

Christian, vous êtes un puits de sciences, toujours prêt à répondre à nos questions et à nous éclairer de vos lanternes. Ce fut un grand plaisir et surtout un grand honneur de travailler avec vous durant ces années de thèse. Merci pour tous les bons moments passés en votre compagnie à Toulouse ou à l'autre bout du monde...Xiè xiè

Stéphanie, vous avez été une seconde mère pour moi, toujours prête à me donner votre opinion scientifique avisée, à me rassurer dans les moments difficiles, à faire les allers-retours Castres-Toulouse même pour une réunion de 2 heures... Du fond du cœur, merci et pardon à Juliette et Arthur de leur avoir accaparé leur maman durant l'automne 2012...

Je mesure la chance que j'ai eue d'avoir des chefs comme vous !

Je tiens également à remercier *Christèle Combes*, responsable de l'équipe PPB du CIRIMAT, pour son accueil, sa disponibilité, ses précieux conseils et sa jovialité communicative.

Mes sincères remerciements s'adressent à *Adriana Bigi*, professeur à l'Université de Bologne, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. J'adresse toute ma reconnaissance à *Jean-Michel Bouler*, professeur à l'Université de Nantes, et *Guillaume Penel*, professeur à l'Université de Lille, pour avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse et pour toutes les remarques constructives que vous avez apporté. Je remercie *Pascal Swider*, professeur à l'Université de Toulouse, d'avoir examiné ce travail et pour sa participation au jury.

Je suis très honorée de vos présences à mon jury de thèse et de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec deux laboratoires spécialisés dans la biologie cellulaire, le laboratoire BIOTIS de Bordeaux dirigé par *Joëlle Amédée* et le laboratoire IGFL de Lyon dirigé par *Pierre Jurdic* et de participer aux tests cellulaires. Je souhaite exprimer ma reconnaissance à chacun des membres de ces équipes qui ont permis de faire avancer ce sujet (*Reine, Chantal B., Silke et Chantal D.* notamment). Merci pour votre accueil chaleureux, pour votre implication dans ce travail et pour le temps que vous avez consacré à m'initier à la biologie cellulaire.

Je souhaite également adresser mes remerciements au personnel technique et scientifique du laboratoire pour leur soutien et leur contribution à ce travail.

Je ne peux remercier suffisamment *Gérard Dechambre*, pour sa disponibilité, sa patience et nos discussions durant l'élaboration des milliers de pastilles. Je vous souhaite une bonne retraite. Un grand merci à *Olivier Marsan* pour son aide précieuse, son œil avisé et sa grande implication dans le dosage quantitatif du tiludronate par spectroscopie Raman ainsi que pour

nos conversations du midi. Je remercie également *Cédric Charvillat* et *Françoise Bosc* pour leur aide et leur disponibilité. J'ai apprécié de travailler avec chacun d'entre vous.

Je tiens également à remercier :

Mélanie Levasseur et *Emmanuelle Picot*, pour leur implication dans ce travail en tant que stagiaires,

Maëlen Aufray, pour les mesures de cinétique de mouillabilité,

Lucien Datas, pour les observations au Microscope Electronique en Transmission,

Christine Roques, pour les tests de microbiologie initiés,

Sandrine Cavalie, pour les mesures de surface spécifique,

Sophie Cazalbou, pour les mesures de porosité,

Fabien Brouillet, pour les tests de cinétique de dissolution.

Pierre Gras, pour la modélisation du mécanisme d'interaction BP/NCA

Yannick Coppel, du LCC, pour les caractérisations par Résonance Magnétique Nucléaire et son implication dans la rédaction de l'article.

Je tiens également à remercier chaleureusement toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces trois années de thèse au CIRIMAT aussi bien en enseignement qu'en recherche et qui ont contribué à cette ambiance de travail si agréable.

J'adresse un merci à mes collègues d'enseignement qui m'ont fait confiance et m'ont permis d'acquérir une expérience pédagogique durant ces trois années de monitorat.

Mes sincères remerciements sont ensuite adressés à mes collègues de bureau, doctorants et permanents, des anciens aux petits nouveaux.

Michèle et Jean-Louis, merci pour votre bonne humeur.

Solène et Ahmed, merci pour votre soutien et votre compagnie dans le bureau.

Imane et Farid, ma grande sœur et mon grand frère de thèse, merci pour tout. Même si vous êtes loin je pense bien à vous, notamment dès que je fais le tajine. Je souhaite plein de la réussite aussi bien professionnellement que personnellement.

Sylvaine, ma voisine de bureau, artiste et globe-trotter à ses heures, merci pour ta bonne humeur, ta sympathie et courage pour la rédaction, si tu as besoin tu sais où me trouver.

Marie-Alix et Anne, les mamans dentistes de l'équipe, merci pour votre gentillesse.

Hassan, merci pour ta sympathie.

Pierre, le grand blond, merci pour ton aide précieuse, ta gentillesse et ton humour.

Manue, la bretonne et la petite dernière du bureau, merci pour ta gentillesse.

Audric, l'exilé de Castres, bienvenu dans l'équipe et bonne route.

Nicolas, mon compagnon de thèse, un grand merci pour ton aide, ta disponibilité sans faille et ta gentillesse. Merci pour tous ces bons moments passés en compagnie de ta petite famille en dehors du labo.

Sabrina, ma copine d'anglais et de pauses café. Je te souhaite plein de bonheur pour la suite.

Ghyslaine et Jérémy, les nouveaux de l'équipe, un grand merci pour votre soutien précieux et votre disponibilité dans la préparation des qualif et des postes de maitre de conf' ainsi que dans la préparation de mes enseignements d'ATER.

David, merci pour ton aide, ta disponibilité, ta joie de vivre et ta gourmandise

Christophe, merci pour ton soutien et ta bonne humeur communicative.

Domi et Jany, merci pour votre efficacité et votre sourire.

Merci aussi à toute la composante pharma de l'équipe (Fabien, Sophie C., Sandrine, Audrey, Alex...) merci pour votre accueil, vos conseils, votre disponibilité et votre bonne humeur.

Merci pour tous ces bons moments passés en votre compagnie.

Je souhaite également adresser ma reconnaissance à *Chantal Damia*, qui m'a orienté vers cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance.

Je termine en remerciant toute ma famille et tout particulièrement mes parents pour leur soutien depuis toujours même s'ils ne comprenaient pas toujours quand je leur expliquais ce que je faisais... Merci aussi à mon frère, l'autre docteur Pascaud, pour m'avoir soutenu et montré la voie de la thèse.

Enfin, je remercie du fond de mon cœur, Anthony, pour son soutien et ses encouragements sans faille durant cette période pas toujours facile... Merci mon amour.

Abréviations

ALP ou Pal : Phosphatase alcaline
BCP: Phosphate de calcium biphasique
BET: Mesure de surface spécifique – Méthode de Brunauer-Emmett-Teller
BMP : Protéine morphogénétique osseuse
BSA : Sérum d'albumine bovine
BP : Tiludronate
BPs : Bisphosphonates
 β TCP : Phosphate de calcium tricalcique de type β
Cbfa : *Core Binding Factor*
CDA : Apatite déficiente en calcium
DRX : Diffraction des rayons X
EDS : Détecteur de rayons X à énergie dispersive
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
FCS : Sérum de veau fœtal
FTIR : Infrarouge à transformée de Fourier
HA : Hydroxyapatite
HOP : Cellules ostéoprogénitrices humaines
HBMSC : Cellules souches mésenchymateuses humaines
ICP-AES : Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif
JCPDS-ICDD : Standards et données internationales de diffractions
M-CSF : *Macrophage-Colony Stimulating Factor*
MEB : Microscope électronique à balayage
MET : Microscope électronique en transmission
MMP : Métalloprotéases
NCA : Apatite nanocristalline biomimétique
NCA+BP : Apatite nanocristalline biomimétique ayant adsorbée du tiludronate
OB : Ostéoblastes
OC : Ostéoclastes
Oc : Ostéocalcine
OCP : Phosphate octocalcique
OPG : Ostéoprotégérine
PTH : Parathormone ou Hormone parathyroïdienne
RANK : *Receptor Activator of Nuclear factor κ B*
RANKL° : *Receptor Activator of Nuclear factor κ B Ligand*
RMN : Résonance magnétique nucléaire
TRAP : Phosphatase acide tartrate résistante
XPS/ESCA : *X-Ray Photoelectron Spectroscopy/Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*

Sommaire

Introduction générale	7
Chapitre 1 Revue bibliographique	13
I. Le tissu osseux	15
I. 1. Les fonctions du tissu osseux	15
I. 2. L'architecture du tissu osseux	15
I. 3. Eléments constitutifs de l'os	18
I. 3. 1. La matrice organique.....	18
I. 3. 2. La phase minérale	20
I. 3. 3. Les cellules de l'os	24
I. 4. Le remodelage osseux	26
I. 4. 1. Les différentes phases du remodelage osseux.....	26
I. 4. 2. La régulation du remodelage osseux.....	29
II. Les maladies osseuses	30
II. 1. Le capital osseux.....	30
II. 2. Ostéoporose	30
II. 2. 1. Définitions	30
II. 2. 2. Différents types d'ostéoporose	31
II. 2. 3. Facteurs à risque	31
II. 2. 4. Diagnostic de l'ostéoporose : T-Score.....	32
II. 2. 5. Quelques chiffres	32
II. 3. Maladie de Paget : une autre maladie osseuse.....	32
III. Les traitements des maladies osseuses	33
III. 1. Les agents thérapeutiques d'hier et d'aujourd'hui	33
III. 2. Les bisphosphonates (BPs).....	34
III. 2. 1. Historique	34
III. 2. 2. Structure moléculaire.....	35
III. 2. 3. Mécanismes d'actions	37
III. 2. 4. Un bisphosphonate : le tiludronate	39
Chapitre 2 « Physico-chimie des apatites nanocristallines biomimétiques – Adsorption et libération de tiludronate sur des modèles du minéral osseux »	43
A. <i>Introduction bibliographique</i>	45
I. Adsorption.....	45
I. 1. Isotherme de Langmuir	45
I. 2. Isothermes Langmuir-Freundlich et Töth	46
I. 3. Isotherme Freundlich.....	47
I. 4. Isotherme BET	47
II. Adsorption de molécules d'intérêt biologiques sur des phosphate de calcium apatitiques. 48	
B. <i>Synthèse et caractérisation physico-chimique des apatites biomimétiques</i>	52
I. Synthèse des matériaux.....	52

II. Caractérisation	53
II. 1. Analyses chimiques : dosage des ions calcium, phosphate et carbonate	53
II. 2. Mesures de surface spécifique	54
II. 3. Taille et morphologie des particules	55
II. 3. 1. Diffraction des rayons X	55
II. 3. 2. MET	58
II. 3. 3. Analyses granulométriques	59
II. 4. Analyses spectroscopiques	60
II. 4. 1. FTIR	60
II. 4. 2. RAMAN	64
II. 4. 3. RMN du solide	66
C. Adsorption et libération de molécules de tiludronate sur des apatites biomimétiques	69
I. Adsorption	69
I. 1. Principe actif : tiludronate disodique hémihydraté	69
I. 1. 1. Caractérisation du principe actif	69
I. 1. 1. a. Equilibres de dissociation	69
I. 1. 1. b. FTIR	70
I. 1. 1. c. RAMAN	70
I. 1. 1. d. RMN du solide	71
I. 1. 2. Dosage du principe actif en solution	72
I. 2. Protocole d'adsorption	73
I. 3. Cinétique d'adsorption	74
I. 4. Isotherme d'adsorption	75
I. 4. 1. Choix du modèle d'adsorption	75
I. 4. 2. Isotherme d'adsorption : isotherme de Langmuir	76
I. 5. Caractérisation après adsorption	80
I. 5. 1. Dosage en solution des ions libérés	80
I. 5. 1. a. Dosage en solution des ions phosphate	80
I. 5. 1. b. Dosage en solution des ions calcium	81
I. 5. 2. Caractérisation du support apatitique après adsorption	83
I. 5. 2. a. Dosage des ions carbonates	83
I. 5. 2. b. Diffraction des Rayons X	84
I. 5. 2. c. Observations par microscopie électronique à balayage et analyse EDS	86
I. 5. 2. d. Observations par MET	87
I. 5. 2. e. FTIR	88
I. 5. 2. f. RAMAN	91
I. 5. 2. g. RMN solide	93
I. 5. 3. Quantification sur support apatitique	98
I. 5. 3. a. Méthode de quantification par spectroscopie RAMAN sur solide	98
II. Cinétiques de libération	102
II. 1. Libération de molécules d'intérêt biologique	102
II. 2. Mode opératoire	104
II. 3. Résultats	106
II. 3. 1. Cinétique de libération des molécules de tiludronate	106
II. 3. 2. Mécanisme de libération	108
II. 3. 3. Dosage des ions calcium et phosphate libérés en solution	110
D. Discussions	114

Chapitre 3 Etude du comportement cellulaire des apatites biomimétiques 135

A. Introduction bibliographique..... 137

I. Cellules osseuses.....	137
I. 1. Ostéoblastes.....	137
I. 1. 1. L'origine et la fonction des ostéoblastes.....	137
I. 1. 2. La différenciation des ostéoblastes.....	138
I. 2. Ostéoclastes.....	139
I. 2. 1. L'origine et la différenciation des ostéoclastes.....	139
I. 2. 2. La résorption du tissu osseux mature.....	140
II. Etat de l'art des interactions entre phosphates de calcium, bisphosphonates et cellules osseuses.....	142

B. Etude des supports apatitiques préalable aux tests in vitro 145

I. Elaboration de supports apatitiques.....	145
I. 1. Protocole d'adsorption.....	145
I. 2. Pastilles.....	146
I. 2. 1. Réalisation de pastilles NCA.....	146
I. 2. 2. Stérilisation des pastilles NCA.....	146
II. Caractérisation des supports apatitiques.....	147
II. 1. Caractérisation physico-chimique des pastilles.....	147
II. 1. 1. Porosimétrie à mercure.....	147
II. 1. 2. FTIR.....	147
II. 2. Caractérisation de la surface.....	149
II. 2. 1. Analyse quantitative par XPS/ESCA.....	149
II. 2. 2. DRX.....	152
II. 2. 3. RAMAN.....	154
II. 3. Etude de la cinétique de mouillabilité sur les pastilles NCA.....	156

C. Etudes du comportement des cellules HOP et HBMSC vis-à-vis d'apatites biomimétiques avec ou sans molécules de tiludronate..... 159

I. Matériaux et méthodes.....	160
I. 1. Matériaux.....	160
I. 2. Culture cellulaire.....	160
I. 2. 1. Modèles cellulaires.....	160
I. 2. 2. Origine et obtention des cellules.....	161
I. 2. 3. Conditions de culture.....	161
I. 2. 4. Evaluation cellulaire de la viabilité, de la prolifération, de la différenciation et de la morphologie cellulaire.....	162
I. 2. 4. a. Coloration au Live/Dead.....	162
I. 2. 4. b. Test au MTT.....	162
I. 2. 4. c. Coloration au rouge d'alizarine.....	163
I. 2. 4. d. Observations par microscope électronique à balayage.....	163
I. 2. 5. Analyse de l'expression des gènes.....	163
I. 2. 5. a. Notions de biologie.....	163
I. 2. 5. b. Isolement de l'ARN.....	164
I. 2. 5. c. Contrôles qualité.....	165
I. 2. 5. d. Transcription inverse (RT).....	165

I. 2. 5. e. PCR Quantitative en temps réel (qRT-PCR)	165
II. Résultats.....	167
II. 1. Essais préliminaires	167
II. 1. 1. Cinétiques de pH.....	167
II. 1. 1. a. Mode opératoire	167
II. 1. 1. b. Résultats.....	168
II. 1. 2. Dosage des ions calcium et phosphore en solution.....	169
II. 1. 3. Evolution des supports	171
II. 1. 3. a. Mode opératoire	171
II. 1. 3. b. Résultats.....	171
II. 1. 4. Discussions	173
II. 2. Etude des réponses des cellules HOP et HBMSC vis-à-vis des apatites biomimétiques	178
II. 2. 1. Viabilité cellulaire.....	178
II. 2. 2. Prolifération cellulaire	179
II. 2. 3. Différenciation cellulaire	182
II. 2. 4. Morphologie cellulaire.....	182
II. 2. 5. Expression des gènes	182
II. 3. Etude physico-chimique de l'évolution du support et du milieu de culture cellulaire	186
II. 3. 1. Evolution des matériaux	186
II. 3. 1. a. FTIR.....	186
II. 3. 1. b. Raman.....	189
II. 3. 2. Analyse du milieu : Dosage des ions calcium et phosphate	191
<i>D. Etudes du comportement des cellules pré-ostéoclastiques vis-à-vis d'apatites biomimétiques avec ou sans molécules de tiludronate</i>	<i>195</i>
I. Matériaux et méthodes	195
I. 1. Matériaux	195
I. 2. Culture cellulaire	196
I. 2. 1. Origine des cellules	196
I. 2. 2. Conditions d'isolement et de culture des cellules	196
I. 2. 3. Conditions de culture	196
I. 2. 4. Techniques de caractérisation	196
I. 2. 4. a. Observation des cellules par coloration TRAP	196
I. 2. 4. b. Observation des lacunes de résorption par microscopie	197
II. Résultats.....	197
II. 1. Essais préliminaires	197
II. 2. Etude du comportement cellulaire vis-à-vis des matériaux	198
II. 2. 1. Observation des cellules par coloration TRAP.....	198
II. 2. 2. Observation des lacunes de résorption par MEB.....	200
II. 2. 2. a. HA et β TCP	200
II. 2. 2. b. NCA1, NCA2, NCA1+BP, NCA2+BP	203
<i>E. Discussion.....</i>	<i>205</i>
Conclusion générale	211
Références	219
Annexes.....	237

Introduction générale

Le tissu osseux est composé d'une phase organique constituée essentiellement de collagène et d'une phase minérale constituée d'une apatite phosphocalcique nanocristalline. Ces nanocristaux d'apatite présentent deux caractéristiques majeures : une structure complexe avec une couche hydratée à la surface d'un cœur apatitique et une altération de leur composition avec l'âge modifiant la composition de la phase minérale. Le tissu osseux est en perpétuel renouvellement et ce « remodelage osseux » résulte de l'action combinée de deux types de cellules, des cellules résorbant la matrice osseuse, les ostéoclastes, et des cellules synthétisant la matrice osseuse, les ostéoblastes. Un déséquilibre de ce renouvellement peut apparaître dans le cas de maladies osseuses fréquentes telles que l'ostéoporose, et de maladies plus rares telles que la maladie de Paget. Le traitement actuel le plus prescrit, préventif ou curatif, est l'administration de bisphosphonates, agents thérapeutiques anti-résorptifs de composition variable, caractérisés par une liaison P-C-P. Leur mécanisme d'action s'explique principalement par une forte capacité à s'adsorber sur le minéral osseux ayant pour conséquence une diminution de sa vitesse de dissolution, et une inhibition de l'activité des ostéoclastes [Russell 2007]. Il s'agit donc à la fois d'un phénomène physico-chimique et biologique. Bien que ce traitement s'avère efficace sur la diminution du risque de fractures, son administration par voie systémique (orale ou intraveineuse) est associée à une faible biodisponibilité et génère des effets secondaires indésirables tels que des complications au niveau rénal ou gastrique. De plus, leurs effets à long terme restent relativement méconnus, et certains de ces traitements sont impliqués dans la survenue d'ostéonécroses maxillo-mandibulaires [Coleman 2008].

Des recherches concernant les processus d'adsorption de molécules de principes actifs, et plus particulièrement de bisphosphonates, sur des apatites phosphocalciques ont été menées notamment à fins d'applications biomédicales pour la délivrance d'agents thérapeutiques. La plupart de ces études concernent des apatites bien cristallisées [Nancollas *et al.* 2006] et seuls quelques travaux utilisent des apatites nanocristallines bien qu'elles soient plus proches du minéral osseux [Palazzo *et al.* 2007]. Cependant les phénomènes se produisant à l'interface bisphosphonate/minéral osseux restent mal compris. Il semble donc important de connaître le détail des interactions entre les bisphosphonates et le minéral osseux au travers de modèles expérimentaux et de déterminer l'action des bisphosphonates adsorbés sur l'activité cellulaire.

Dans ce contexte, les travaux présentés dans ce mémoire concerneront une molécule de bisphosphonates, le tiludronate, et auront pour objectifs : (1) de mieux comprendre

l'évolution en milieu biologique d'apatites nanocristallines mimant le minéral osseux à différents stades de maturation (os jeune, os mature et email dentaire) ayant adsorbé ou non des molécules de bisphosphonates ; (2) de déterminer les mécanismes d'interaction mis en jeu lors de l'adsorption de tiludronate sur ces supports biomimétiques dynamiques et d'étudier sa cinétique de libération en relation avec la nature du support et (3) d'étudier l'influence de la nature des supports et de la présence de tiludronate sur le comportement des cellules osseuses.

Le premier chapitre de ce mémoire traite de généralités sur le tissu osseux, les maladies osseuses et les traitements relatifs aux maladies osseuses en se focalisant sur les bisphosphonates et en particulier le tiludronate utilisé dans cette étude.

Après une introduction bibliographique concernant l'adsorption de molécules actives sur les phosphates de calcium, le second chapitre traite dans un premier temps de l'élaboration et de la caractérisation des trois apatites nanocristallines analogues au minéral osseux utilisées dans cette étude, présentant différentes compositions et états de maturation. Puis dans un second temps, nous présenterons nos résultats concernant l'adsorption du tiludronate sur ces apatites nanocristallines, la caractérisation des supports après adsorption et les cinétiques de libération du tiludronate. Une discussion générale des résultats obtenus termine ce chapitre.

Le troisième chapitre débute par une introduction bibliographique sur les cellules et un état de l'art sur les interactions entre les phosphates de calcium, les bisphosphonates et les cellules osseuses. La seconde partie porte sur l'étude des supports apatitiques préalablement aux tests *in vitro*. La troisième partie décrit les résultats obtenus lors de la mise en culture de ces supports avec des cellules humaines ostéoprogénitrices (HOP) et des cellules mésenchymateuses humaines indifférenciées (HBMSC), ainsi que les réponses cellulaires et l'évolution physico-chimique des supports. Enfin une dernière partie est consacrée à la mise en culture des supports avec des cellules ostéoclastiques murines, avant une discussion générale des résultats.

Enfin, les principaux résultats obtenus dans ce travail, leur discussion et les perspectives pour la suite de cette étude feront l'objet d'une conclusion générale.

Chapitre 1

Revue bibliographique

Le tissu osseux présente des fonctions et une composition ainsi qu'un renouvellement permanent qui lui sont caractéristiques et que nous détaillerons dans un premier temps. Les maladies osseuses liées au dérèglement de ce renouvellement et plus particulièrement l'ostéoporose seront ensuite exposées et définies avant d'en présenter les traitements. Nous focaliserons notre attention sur un traitement en particulier, les bisphosphonates qui sont parmi les agents thérapeutiques les plus administrés pour ces pathologies dont nous détaillerons la structure et les mécanismes d'actions en précisant l'exemple du tiludronate utilisé dans cette étude.

I. Le tissu osseux

I. 1. Les fonctions du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif dont la substance intracellulaire est minéralisée. Le squelette exerce plusieurs rôles fondamentaux :

(1) un rôle de soutien : les os constituent une structure rigide servant de support aux tissus mous et de point d'attache aux tendons de la plupart des muscles.

(2) un rôle de protection : les os protègent de nombreux organes internes contre les coups et traumatismes.

(3) un rôle de banque d'ions minéraux : le tissu osseux contribue à maintenir la concentration de calcium et phosphate constante dans le sang, c'est le « *maintien de l'homéostasie phosphocalcique* ». Ainsi, le squelette d'un adulte comporte en moyenne 1000 g de calcium et 500 g de phosphore soit 99% du calcium et 85% du phosphore total de l'organisme [Houillier 2008].

(4) un rôle dans la formation de cellules sanguines : dans l'espace médullaire des os, sont produits les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes au cours du processus de l'hématopoïèse, c'est la fonction « hématopoïétique » de l'os.

I. 2. L'architecture du tissu osseux

Le squelette humain est constitué de 206 os dont la taille, la forme et l'emplacement diffèrent selon leur fonction dans le squelette. Il existe cinq variétés anatomiques d'os (Figure 1-1): les os longs, les os courts, les os plats, les os irréguliers et les os sésamoïdes, l'ensemble formant le squelette humain.

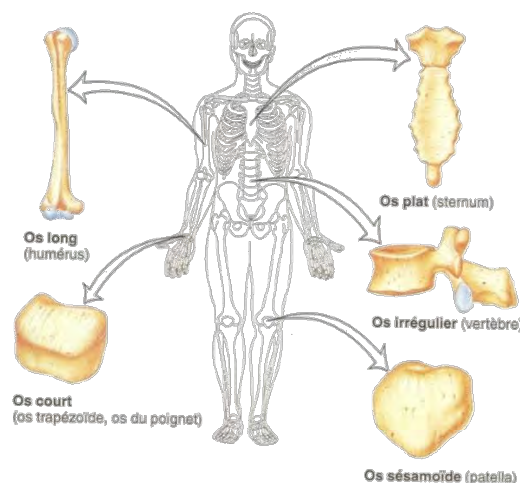


Figure 1-1: Les variétés anatomiques osseuses formant le squelette humain [Tortora *et al.* 2007]

Un os long typique, variété anatomique osseuse la plus représentée du squelette humain, est constitué d'un corps long et cylindrique appelé *diaphyse* et deux extrémités appelées *épiphyse distale et proximale* (Figure 1-1 et 1-3). Lors de la croissance de l'os, le cartilage constitutif des *métaphyses*, région de jonction diaphyse-épiphyse, va devenir de la matière osseuse. Les *épiphyse*s, formées de *tissu spongieux*, sont riches en moelle rouge hématopoïétique.

L'épiphyse, au niveau de l'articulation, est recouverte d'une mince couche de cartilage, le *cartilage articulaire* qui va réduire la friction et absorber les chocs. Aux endroits dépourvus de ce cartilage, la surface osseuse est recouverte d'une épaisse membrane de tissu conjonctif dense irrégulier appelé *périoste*. Le périoste contient les cellules productrices de matière osseuse permettant l'ossification en épaisseur. La *diaphyse* est constituée d'une couche épaisse et dense de tissu osseux dit *os compact*. Elle comporte la *cavité médullaire* (ou *canal médullaire*), remplie de moelle osseuse jaune lipidique, tapissée par une membrane riche en vaisseaux nourriciers appelée *endoste*.

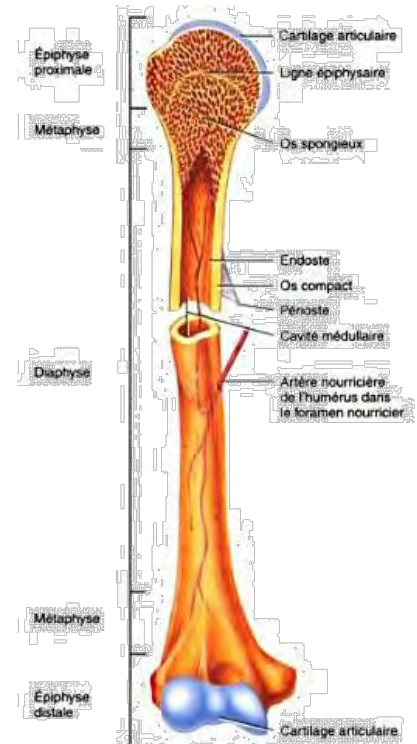


Figure 1-2 Coupe partielle d'un os long [Tortora *et al.* 2007]

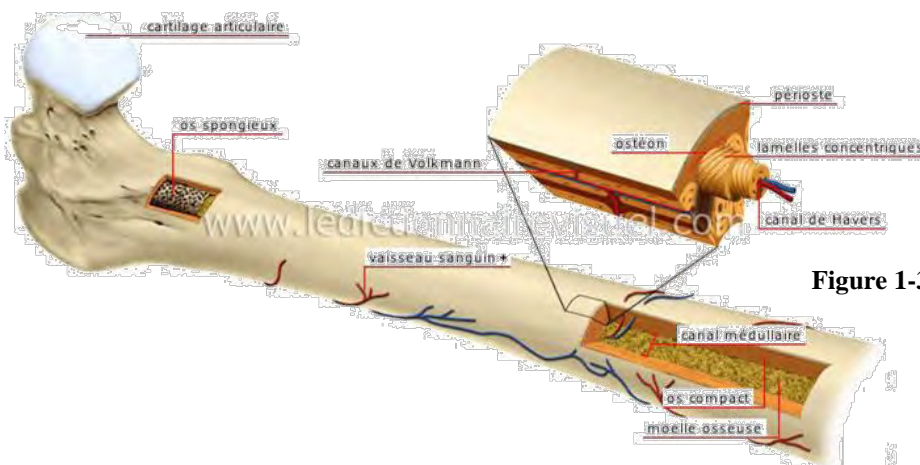


Figure 1-3 Schéma descriptif d'un os long

Suivant la partie de l'os considérée, on distingue deux structures osseuses : l'os spongieux et l'os compact (Figures 1-2, 1-3, 1-4).

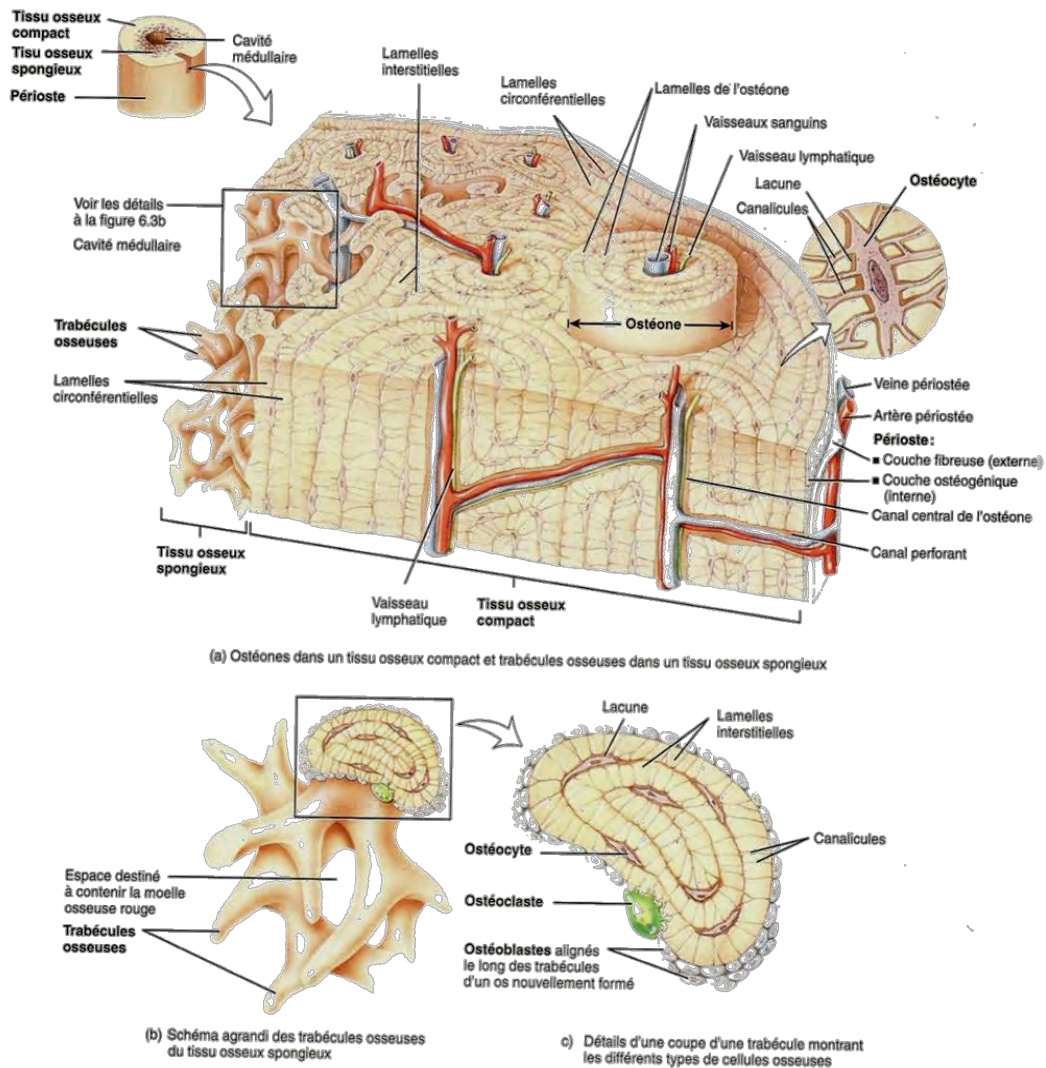


Figure 1-4 Histologie du tissu osseux compact et du tissu osseux spongieux [Tortora *et al.* 2007]

L'os compact aussi appelé *os cortical* constitue la partie périphérique de l'os. C'est une partie osseuse dense, dure et très résistante formant un manchon plus ou moins épais. L'os compact est constitué par la juxtaposition et l'imbrication d'un grand nombre d'ostéons. Les *ostéons* (figures 1-3 et 1-4) sont des unités structurales élémentaires, aussi appelées BSU (*basic structural unit*), formées de lamelles osseuses concentriques, au centre desquelles se trouve le *canal d'Havers*, siège des capillaires sanguins et du tissu osseux. C'est cette structure lamellaire, dite « structure Haversienne », présentant une disposition des fibres collagène en alternance régulière, qui va garantir la résistance mécanique du tissu osseux. Cette structure hiérarchisée n'est acquise qu'au cours de la croissance car durant l'enfance, l'os n'est constitué que d'un os fibreux immature non lamellaire dit « os tissé », caractérisé par la disposition anarchique des fibres collagènes. L'os compact constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os courts et plats et représente à peu près 80-90% du squelette [Libouban 2008; Clunie 2009].

L'os spongieux aussi appelé *os trabéculaire* est riche en cellules conjonctives adipeuses et en éléments sanguins mais sa résistance est faible car il est peu dense. Il est formé de travées osseuses¹ (lamelles osseuses accolées) anastomosées² entre elles. On le retrouve dans la terminaison épiphysaire des os longs, dans les os courts et à l'intérieur des os plats (vertèbres).

I. 3. Éléments constitutifs de l'os

L'os est un tissu conjonctif spécialisé dans lequel sont associées une phase minérale sous la forme de cristaux de phosphate de calcium de structure apatitique (ou apatites) et imbriqués dans une matrice organique fibreuse [Giudicelli *et al.* 1998].

I. 3. 1. La matrice organique

La phase organique de l'os synthétisée par les ostéoblastes, est essentiellement constituée de collagène de type I noté Col1 (90% de la matrice organique) et de protéines non collagéniques osseuses [Giudicelli *et al.* 1998; Mazières 2002].

Le collagène de type I est une protéine fibrillaire organisée en fibres parallèles au sein d'une même couche [Giudicelli *et al.* 1998]. Une chaîne de collagène est formée de la répétition d'une séquence d'acides aminés de motif type Gly-X-Y, où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé (figure 1-5). Grâce à ce motif, une association de trois chaînes de collagène peut avoir lieu formant ainsi une molécule de collagène, en forme de « triple hélice », composée de deux chaînes α_1 et une chaîne α_2 . Une fois la synthèse de ces chaînes terminée, l'assemblage établi est constituée d'une triple hélice continue (Col1) et de deux terminaux : C-terminal (NC1) et N-terminal. Ce dernier est décomposé en une courte séquence (NC2), une courte triple hélice (Col2) et un domaine globulaire (NC3) comme schématisé sur la Figure 1-5 [Malaval 2008].

¹ Travées osseuses : Réseau tridimensionnel continu, criblé de cavités assez volumineuses pour être visibles à l'œil nu.

² Anastomosées : Structures réunies et communiquant entre elles

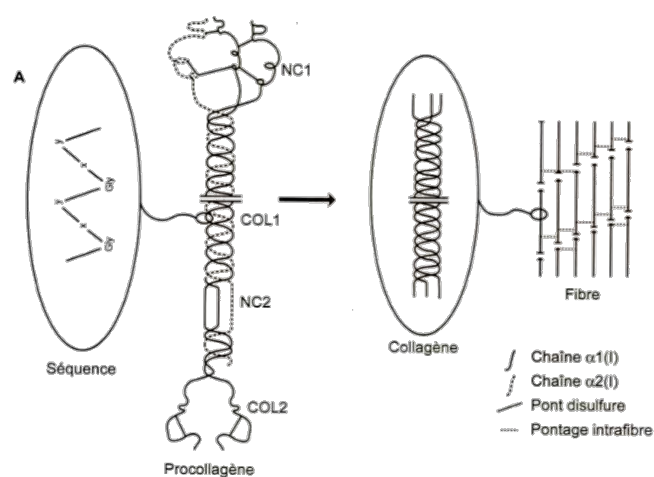


Figure 1-5 Structure et maturation d'un collagène fibrillaire du type I [Malaval 2008]

Après maturation par clivage enzymatique, les molécules de collagène s'alignent dans la matrice extracellulaire de telle façon qu'une extrémité N-terminal lie une extrémité C-terminal afin de constituer des fibres. Les fibres de collagène sont séparées par un espace constant (40 nm) et décalées les unes des autres (67 nm soit $\frac{1}{4}$ de leur longueur) (Figure 1-6), créant ainsi des « lacunes », lieu de la nucléation des premiers cristaux de phosphate de calcium lors de la minéralisation de la matrice osseuse [Landis 1995; Malaval 2008]. Chacune de ces couches présente une orientation différente de ses fibres donnant ainsi l'aspect lamellaire au tissu osseux [Giudicelli *et al.* 1998].

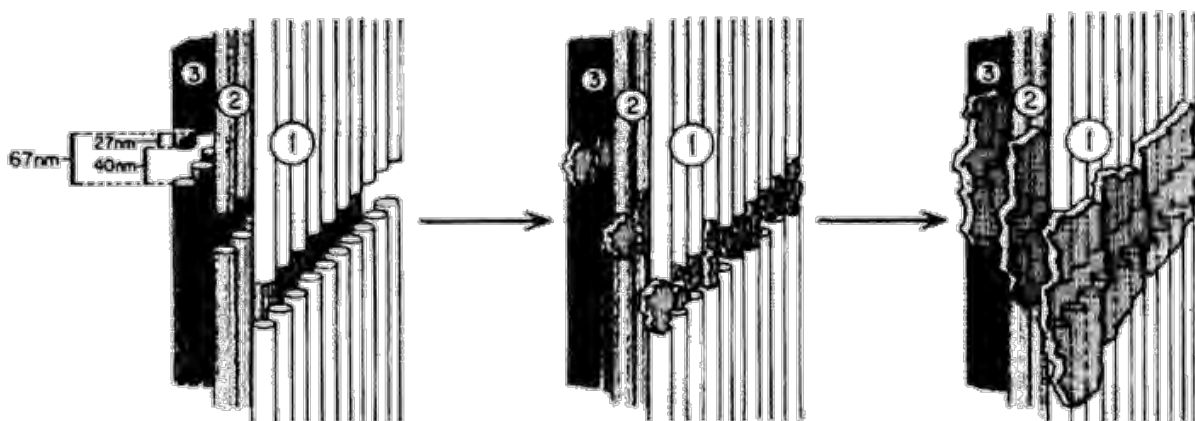


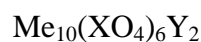
Figure 1-6 Illustration schématique de la structure du collagène de type I [Landis 1995]

Les protéines non collagéniques osseuses telles que : l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine et la sialoprotéine osseuse jouent probablement un rôle important dans la nucléation et la croissance des cristaux d'apatites, mais aussi dans la résorption et la formation osseuse [Mazières 2002].

I. 3. 2. La phase minérale

La partie minérale des os est composée essentiellement de cristaux d'apatite phosphocalcique déposés parallèlement aux fibres de collagène. Elle assure la rigidité de la matrice osseuse et participe à l'homéostasie phosphocalcique. Sa composition et sa structure dépendent de nombreux paramètres tels que la nature de l'os, l'âge des individus, le régime alimentaire et les maladies.

Les apatites constituent une famille de composés isomorphes cristallisant généralement dans le système hexagonal avec le groupe d'espace $P6_3/m$ et sont généralement représentées par la formule chimique type :



Avec : *Me* : un métal bivalent, *XO₄* : un anion trivalent et *Y* : un anion monovalent

La principale caractéristique de cette structure est sa capacité à accepter de nombreux substituants. Le site cationique bivalent Me^{2+} peut être occupé par un ion monovalent, bivalent, trivalent ou une lacune. Les groupements anioniques trivalents XO_4^{3-} peuvent être remplacés par des groupements bivalents ou tétravalents tandis que les sites correspondant aux anions monovalents Y^- peuvent être occupés par des ions monovalents, bivalents ou des lacunes. Le tableau 1-1 répertorie quelques exemples de substitutions possibles dans les apatites.

Me^{2+}	XO_4^{3-}	<i>Y</i>
Ca ²⁺ Mg ²⁺ Cu ²⁺ Na ⁺	PO ₄ ³⁻ SO ₄ ²⁻ CrO ₄ ²⁻	OH ⁻ Br ⁻ S ²⁻ F ⁻ I ⁻
Sr ²⁺ Ba ²⁺ Zn ²⁺ K ⁺	SiO ₄ ⁴⁻ MnO ₄ ⁻ CO ₃ ²⁻	O ²⁻ Cl ⁻ □ CO ₃ ²⁻
Cd ²⁺ Pb ²⁺ □ Eu ³⁺	AsO ₄ ³⁻ VO ₄ ³⁻ HPO ₄ ²⁻	

Tableau 1-1: Exemples de substitutions ioniques dans la structure des apatites

L'hydroxyapatite synthétique (HA) est une des apatites phosphocalciques stœchiométriques les plus stables thermodynamiquement. Sa formule chimique est : $Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2$. Elle possède un rapport atomique Ca/P = 10/6 et cristallise, généralement, dans le système hexagonal de groupe d'espace $P6_3/m$. Les paramètres cristallographiques de la maille sont les suivants (JCPDS-ICDD 9-432) :

$$a = b = 9,418 \text{ \AA} \text{ et } c = 6,881 \text{ \AA} \quad \alpha = \gamma = 90^\circ \text{ et } \beta = 120^\circ \quad [\text{Kay } et \text{ al. } 1964]$$

La maille cristalline contient un motif $Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2$. Sa structure peut être décrite en considérant un empilement hexagonal de groupements PO_4^{3-} laissant apparaître deux types de tunnels parallèles à l'axe c. Le premier tunnel (tunnel I, figure 1-7), coïncidant avec l'axe

ternaire de la structure, est occupé par les ions calcium : CaI tandis que le second tunnel (tunnel II, figure 1-7), centré sur l'axe sénaire hélicoïdal du réseau est occupé par les ions OH⁻ et est bordé par les atomes d'oxygène et par d'autres ions calcium, CaII. Les deux triangles formés par les 6 CaII, constitutifs du tunnel II, sont localisés à $z=1/4$ et $3/4$ (figure 1-8). La répartition spatiale de ces groupements phosphates dans le cristal confère à la structure apatitique une grande stabilité [LeGeros 1981].

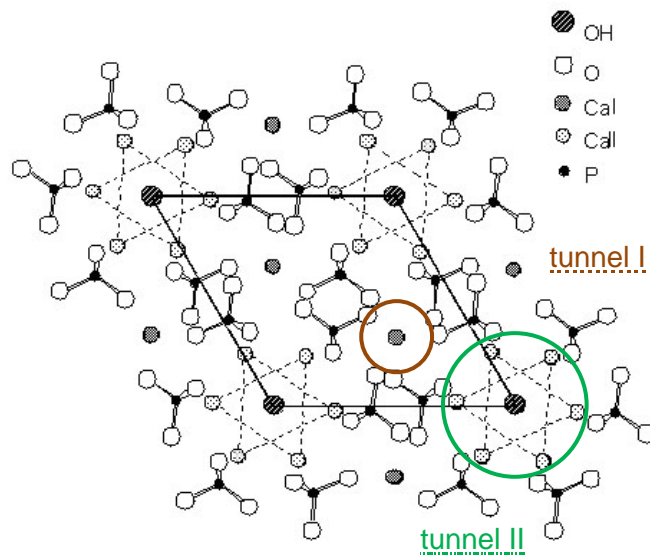


Figure 1-7:
Projection sur le plan de base (001)
de la maille de l'HA [Young 1973].

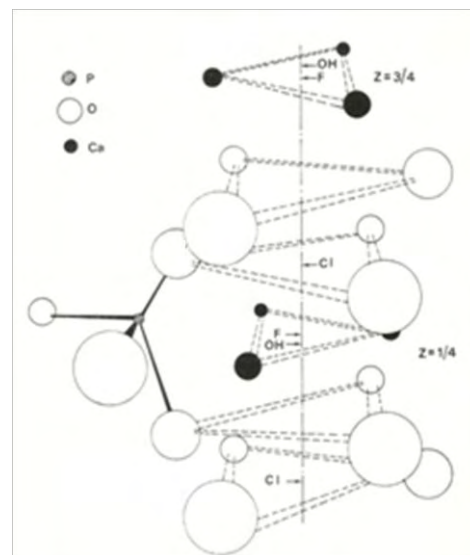


Figure 1-8:
Environnement de l'axe sénaire
hélicoïdal [Bonel 1972]

La présence et surtout la taille de ces tunnels (diamètres de 2,5Å pour le tunnel I et de 3-4,5Å pour le tunnel II) confèrent aux apatites des propriétés d'échangeurs d'ions et d'accepteurs de petites molécules (O₂, H₂O, glycine) [Montrejaud 1973; Rey *et al.* 1978; Rey 1984].

Une des principales caractéristiques de l'hydroxyapatite et plus généralement des apatites est d'admettre un grand nombre de substitutions, celles-ci laissant inchangée la structure cristallographique [Young 1973] mais modifient les paramètres de maille (a et c).

Les substitutions de valences différentes sont possibles à condition de maintenir la neutralité électrique du réseau en réalisant des substitution couplée ou en créant des lacunes sur les sites cationiques (Ca^{2+}) ou sur les sites anioniques (OH^-). Par exemple, si l'on s'intéresse à la carbonatation des apatites phosphocalciques, Bonel *et al.* [Bonel 1972] ont montré que les ions carbonates se substituent aux sites anioniques (OH^- et PO_4^{3-}) :

- La substitution des OH^- par des ions CO_3^{2-} correspond à une carbonatation dite de « type A ».

Les carbonates occupent ainsi les tunnels I le long de l'axe sénaire hélicoïdal :



- La substitution des ions PO_4^{3-} par des ions CO_3^{2-} correspond à une carbonatation dite de « type B ».

Il semble exister différents systèmes de compensation de charge pour ce type de substitution. Le plus commun associe à chaque ion carbonate de type B une lacune calcium dans les sites II et une lacune dans les sites anioniques monovalents [Bonel 1972]. Ce type de compensation de charge est notamment celui qui prédomine dans les apatites biologiques : $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$. Une autre compensation de charge, beaucoup moins fréquente et essentiellement présente dans les apatites de synthèse correspond au remplacement d'un ion PO_4^{3-} par un ion CO_3^{2-} et un ion OH^- occupant la lacune oxygène laissée par l'ion carbonate [Vignoles 1984]. Cette perturbation de la structure apatitique conduit à une augmentation de la solubilité du composé par rapport à celle de l'HA [LeGeros 1991].

Toutefois, la composition de l'hydroxyapatite stœchiométrique ne correspond pas à la phase minérale de l'os puisque celle-ci est décrite comme déficiente en calcium, carbonatée, contenant des ions HPO_4^{2-} et des lacunes sur les sites anioniques monovalents. Cette composition est représentée par la formule chimique :



De plus, l'apatite osseuse est caractérisée par une cristallinité faible, engendrée notamment par la taille nanométrique des cristaux et la présence de lacunes liée à l'écart à stœchiométrie, contrairement à l'hydroxyapatite comme en témoigne leurs diagrammes de diffraction respectifs (figures 1-9 et 1-10).

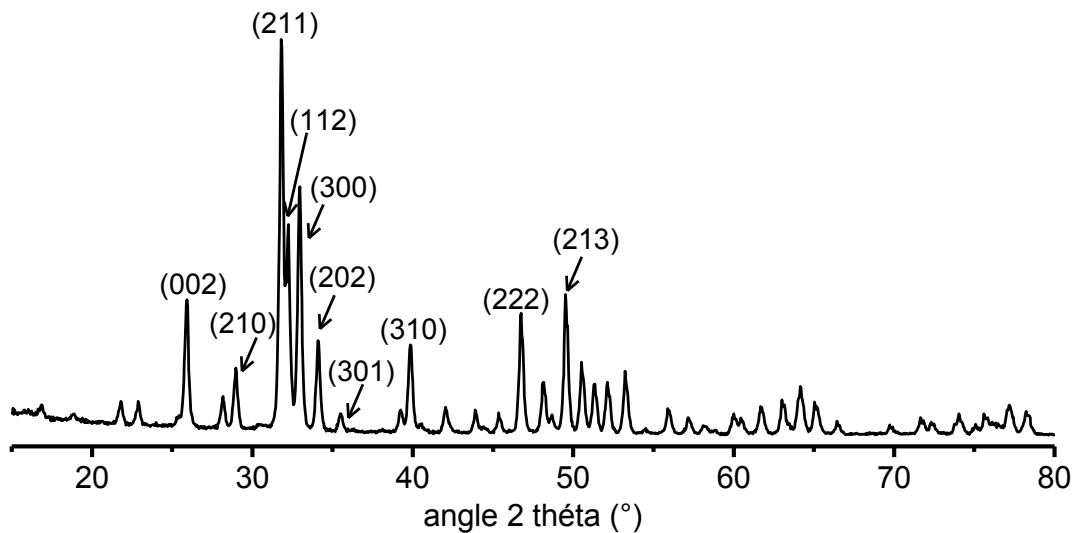


Figure 1-9: Diagramme de diffraction de l'hydroxyapatite

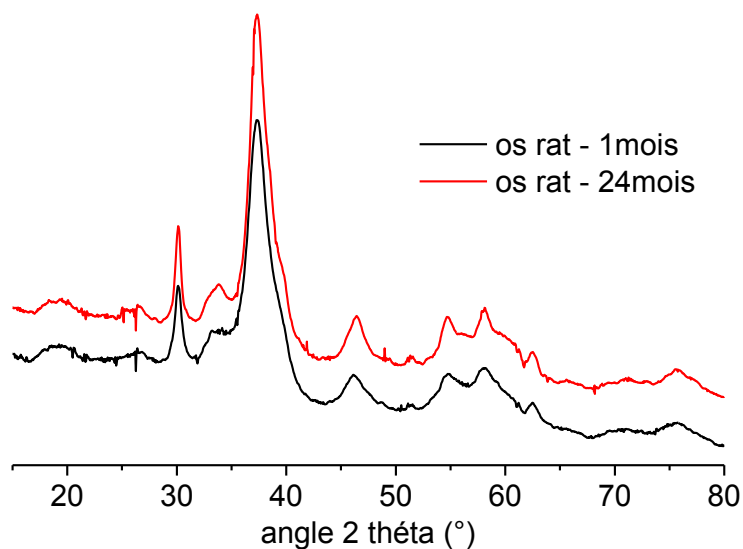


Figure 1-10: Diagramme de diffraction des rayons X d'os de rat âgé de 1 mois et 24 mois

Cette apatite nanocristalline déficiente en calcium constitutive de la phase minérale de l'os présente une autre caractéristique puisqu'elle possède une couche hydratée en surface aussi appelée « couche labile » composée d'ions majoritairement bivalents entourant le domaine apatitique présent au cœur du cristal (figure 1-11) [Rey *et al.* 2007]. Cette couche hydratée permet des échanges avec les fluides environnants (figure 1-11) pouvant être composés de molécules d'intérêt biologique telles que les protéines (Pr sur la figure 1-11) ou les molécules actives.

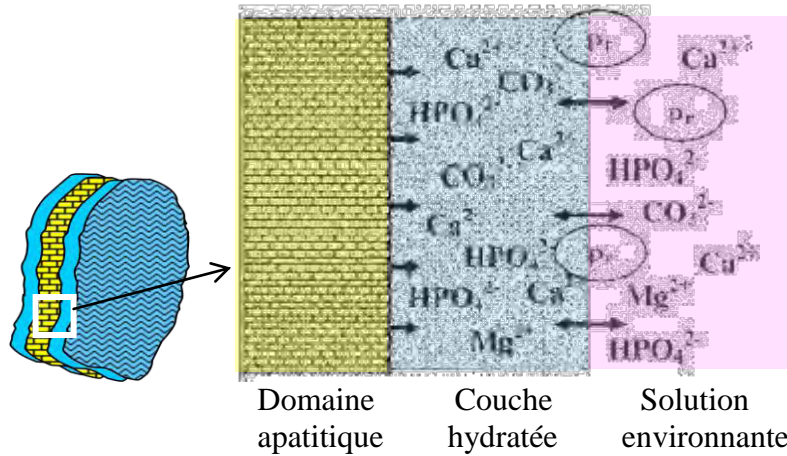


Figure 1-11: Représentation schématique de la couche hydratée en surface du domaine apatitique [Rey *et al.* 2007; Eichert *et al.* 2008]

La composition du cristal dépend directement de son état de maturation. Les travaux de Cazalbou *et al.* [Cazalbou *et al.* 2004] ont montré que la maturation de ces apatites nanocristallines (leur vieillissement en solution) s'accompagne d'une diminution de la couche labile au profit des domaines apatitiques (figure 1-12).

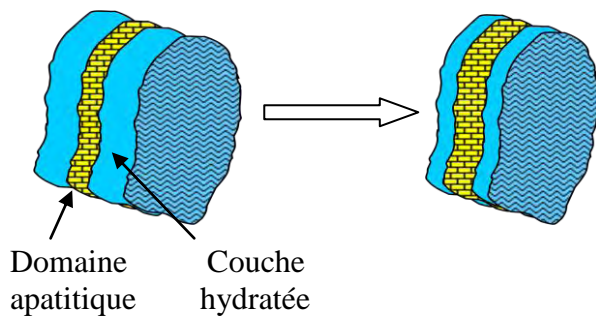


Figure 1-12: Représentation schématique de la maturation de la couche hydratée [Cazalbou *et al.* 2004]

Des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux (NCA) sont synthétisées et étudiées au sein de notre équipe. Elles répondent aux critères de non stœchiométrie, de nanométrie des cristaux de l'apatite biologique et constituent donc des modèles de choix du minéral osseux.

1.3.3. Les cellules de l'os

Le tissu osseux comprend quatre types de cellules : les cellules ostéogéniques, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes appartenant respectivement à deux grandes lignées cellulaires : ostéoblastique et ostéoclastique (figure 1-13) constituant un ensemble cellulaire appelé BMU (*basic multicellular unit*) [Tortora *et al.* 2007; Libouban 2008].

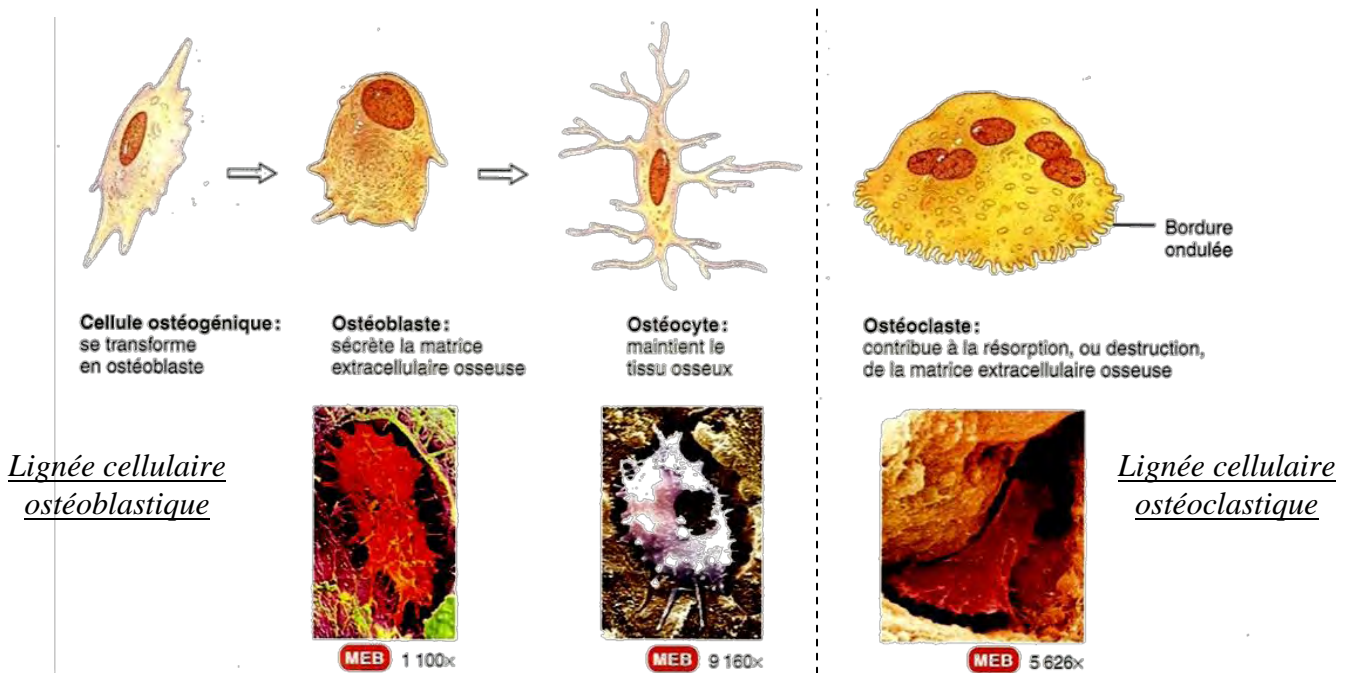


Figure 1-13 Les types de cellules dans le tissu osseux, d'après [Tortora *et al.* 2007]

Les cellules de la lignée ostéoblastique sont d'origine mésenchymateuse et sont identifiées comme suit :

Les cellules ostéogéniques sont des cellules souches non spécialisées dérivées du mésenchyme³. Ces cellules sont capables de se diviser et leurs cellules filles se transforment en ostéoblastes. Les cellules ostéogéniques sont présentes dans la partie interne du périoste, dans l'endoste ainsi qu'à l'intérieur de l'os dans les canaux sanguins.

Les ostéoblastes sont des cellules, dérivant des cellules ostéogéniques, responsables de la formation et de la minéralisation de la matrice osseuse. Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées de forme cubique ou cylindrique, hautement polarisées qui synthétisent la matrice organique de l'os : l'*ostéoïde*, le long de l'interface entre les ostéoblastes et l'os, en sécrétant des fibres collagènes et d'autres composantes organiques nécessaires à la formation de la matrice osseuse ; elles amorcent la calcification et contrôlent la minéralisation.

Les ostéocytes sont des cellules osseuses matures, les plus différenciées de la lignée ostéoblastique, présentes en abondance dans le tissu osseux. Les ostéocytes sont des dérivés des ostéoblastes emprisonnés dans les sécrétions de la matrice. Cependant, les ostéocytes ne sécrètent plus la matrice ils jouent un rôle de maintenance du tissu osseux.

Les ostéoclastes appartenant à la lignée cellulaire ostéoclastique proviennent, quant à elles, de cellules dérivées de la fusion de plusieurs monocytes (un type de globules blancs) concentrés dans l'endoste, qui vont se différencier en pré-ostéoclastes. Les ostéoclastes sont des cellules

³ Mésenchyme : Tissu de l'embryon à partir duquel sont formés les vaisseaux, les muscles, le squelette et le cartilage

géantes pouvant atteindre 100µm de diamètre, plurinucléées et fortement polarisées qui contribuent à la résorption du tissu osseux.

I. 4. Le remodelage osseux

Ainsi, les cellules osseuses jouent un rôle essentiel dans le renouvellement osseux [Clunie 2009] grâce à l'action combinée des ostéoblastes synthétisant la matrice osseuse néoformée et des ostéoclastes résorbant le tissu osseux ancien.

I. 4. 1. Les différentes phases du remodelage osseux

Le processus du remodelage osseux consiste à remplacer un tissu osseux ancien par un tissu osseux nouveau. Chez l'adulte jeune, chaque cycle est équilibré, il y a autant de résorption que de formation. Alors que chez les personnes atteintes d'ostéoporose, il y a un excès de résorption qui va engendrer la perte osseuse. Le remodelage osseux renouvelle le tissu osseux et donne la possibilité à l'os de maintenir une structure et une minéralisation lui permettant de remplir ses fonctions mécaniques, statistiques et dynamiques. Chez l'adulte, la phase de résorption a une durée d'environ une à deux semaines alors que la phase de formation osseuse s'établit sur environ trois mois.

Lors du remodelage osseux l'organisation des BMU a lieu de façon différente entre l'os cortical et l'os trabéculaire. Ainsi leur nombre et leur fréquence d'activation sont supérieurs dans l'os trabéculaire. Aussi, le dérèglement du remodelage a des répercussions bien plus importantes sur l'os trabéculaire que sur l'os cortical [Libouban 2008].

Ce remodelage osseux est un cycle constitué de cinq phases (figure 1-14) [Giudicelli *et al.* 1998; Libouban 2008]. Il commence toujours par une **phase de résorption**. Tout débute par la production de collagénase par les cellules bordantes à la surface du tissu qui permet à celles-ci de digérer la fine couche de collagène sur laquelle elles reposaient [Libouban 2008]. Une zone de résorption est alors créée par les ostéoclastes par érosion de la surface trabéculaire. Les ostéoclastes libèrent des protons, grâce à leur pompe H⁺-ATPase, créant ainsi une acidification (pH = 5) du micro-compartiment de résorption qui permet la dissolution de la matrice osseuse. De plus, la synthèse et la sécrétion d'enzymes par ces ostéoclastes dans ce même micro-compartiment dégradent la composante organique de la matrice osseuse. Ces actions concomitantes mènent à la formation d'une lacune de résorption appelée *lacune de Howship*. Les ostéoclastes creusent de proche en proche à une profondeur d'environ 40µm. La dissolution des cristaux d'apatite favorisée par l'environnement acide de la lacune de résorption libère des minéraux tel que le calcium. La dégradation de la matrice

osseuse engendre une augmentation du calcium dans la lacune de résorption. Le calcium absorbé par la cellule engendre une désorganisation de l'adhésion (*dissociation intégrine-ostéopontine*).

Une fois la lacune de Howship achevée et la résorption terminée, les ostéoclastes meurent par apoptose. Avant de mourir, les ostéoclastes libèrent des facteurs de croissance attirant ainsi des cellules mononucléées de nature imprécise (précurseurs de cellules osseuses et/ou cellules macrophagiques chargées d'achever la résorption des fragments collagéniques mis à nus) qui se déposent ensuite sur l'endroit érodé. Cette étape est dénommée **phase d'inversion**.

Puis, les ostéoblastes se différencient localement et débutent la **phase de formation** consistant à combler la zone préalablement résorbée. Cette phase de formation est constituée de deux étapes successives : la production de la matrice extracellulaire et sa minéralisation. La production de la matrice extracellulaire a lieu grâce à la prolifération et à l'activité des ostéoblastes matures. Les ostéoblastes combleront la lacune de résorption en apposant des couches concentriques d'os néoformé et non calcifié synthétisant ainsi une trame protéique : l'*ostéoïde*. La fixation des ions minéraux calcium et phosphate sur le tissu ostéoïde aboutit à la production de la matrice extracellulaire. La minéralisation, quant à elle, a lieu à l'interface tissu ostéoïde/tissu minéralisé. Cette minéralisation permet au tissu d'acquérir sa solidité. Les ions calcium et phosphate sont stockés ensemble par les ostéoblastes au sein du cytoplasme de la cellule produisant ainsi un complexe phosphocalcique. Des cristaux d'apatite biologique, provenant de l'élimination du complexe vers la matrice osseuse, sont ensuite créés et se déposent au niveau des fibres de collagène. Lors de la formation osseuse, certains ostéoblastes sont piégés dans la matrice osseuse néoformée, aussi appelée BSU (*basic structural unit*), devenant ainsi des *ostéocytes*.

Une fois la synthèse de la matrice osseuse néoformée terminée, les ostéoblastes s'aplatissent, ralentissent leur activité et se transforment en cellules bordantes recouvrant ainsi la majorité de la surface de l'os et empêchant l'accès des ostéoclastes. Cette phase est appelée la **phase de quiescence**. Ces cellules au repos traduisent l'état latent du remodelage.

Sous l'action de divers signaux hormonaux, physiques et biologiques, les cellules bordantes se rétractent et les pré-ostéoclastes migrent vers la surface de l'os débutant ainsi la **phase d'activation**. Les pré-ostéoclastes, cellules immatures, fusionnent alors en ostéoclastes et les ostéoclastes s'attachent finalement à la matrice osseuse afin de pouvoir exercer leur action de résorption.

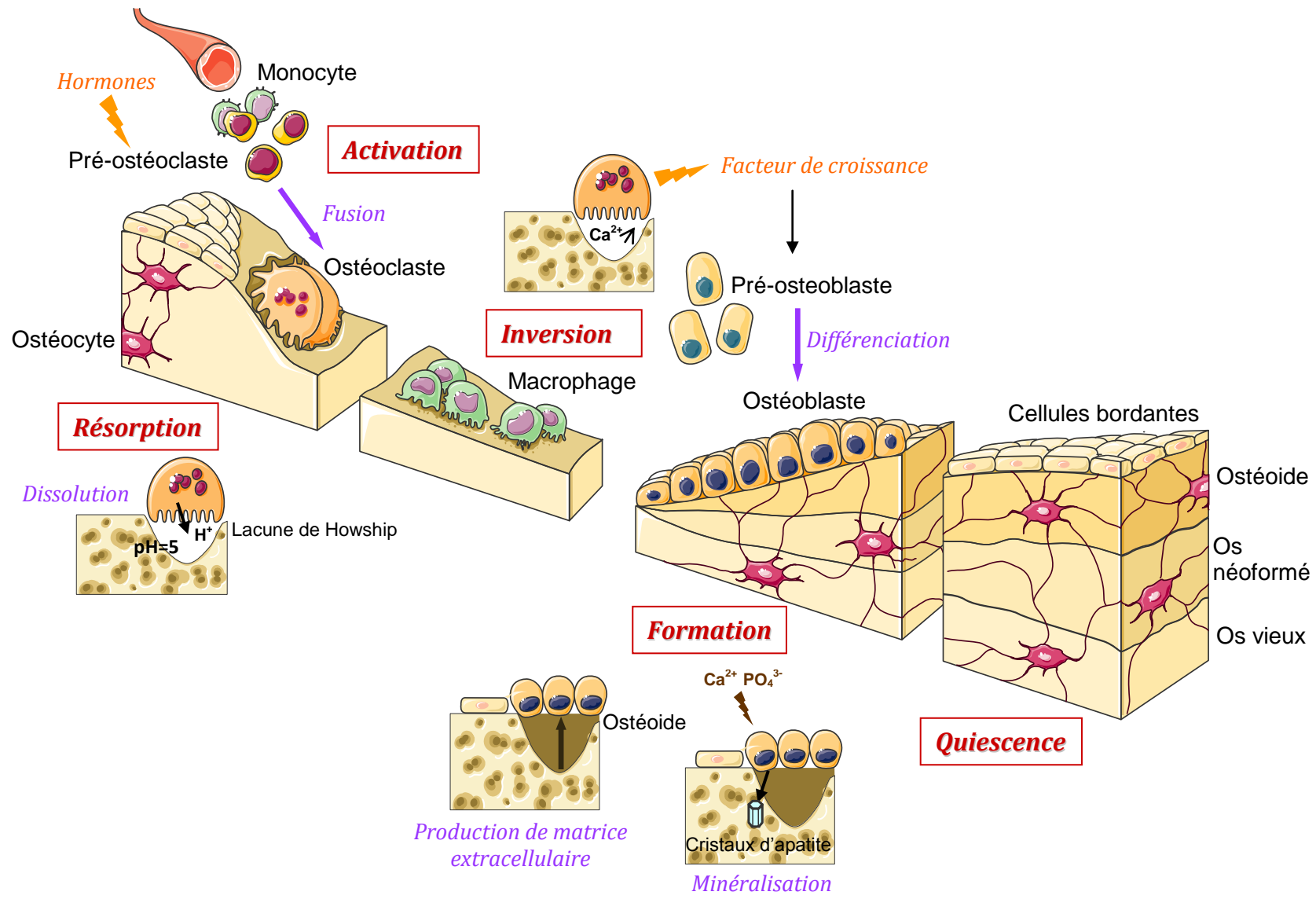


Figure 1-14 Représentation schématique du cycle du remodelage osseux - Adapté de Servier Medical Art

1. 4. 2. La régulation du remodelage osseux

Les systèmes hormonaux (vitamine D, parathormone, calcitonine, hormones sexuelles) semblent intervenir directement ou indirectement dans la régulation du remodelage osseux mais elles n'agissent le plus souvent que de façon indirecte par le biais de cytokines sécrétées par le lymphocyte ou l'ostéoblaste [Mazières 2002].

La régulation du remodelage osseux serait issue d'une « coopération cellulaire ». Ce n'est que récemment, à la fin des années 1990 que la nature de cette régulation a été identifiée comme un système : RANK/RANKL/OPG. Ce système joue un rôle primordial dans le contrôle de l'ostéoclastogénèse. En effet, les ostéoblastes contrôlent l'ostéoclastogénèse grâce à la production de deux cytokines indispensables à la différenciation de l'ostéoclaste, à savoir : le facteur M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) qui stimule la prolifération des macrophages et l'activateur RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) qui intervient dans la genèse de l'ostéoclaste. Le récepteur de ce dernier est le RANK, il est exprimé par les ostéoclastes. La Liaison RANK/RANKL induit l'expression des gènes qui gouverne la différenciation, l'activation des ostéoclastes (figure 1-15). L'ostéoprotégérine (OPG), également sécrétée par les ostéoblastes, joue quant à elle le rôle d'inhibiteur du RANKL et se lie au récepteur RANK inhibant la maturation des ostéoclastes (figure 1-15). La production d'OPG est gouvernée par la parathormone (PTH) qui module ainsi l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes.

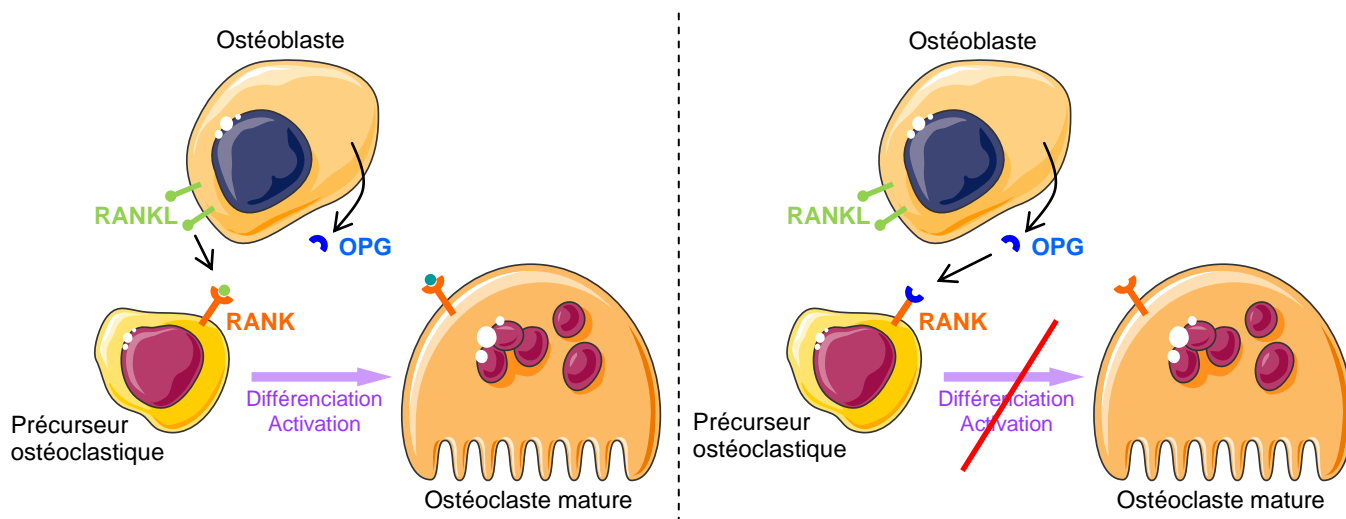


Figure 1-15 Schéma du système RANK/RANKL/OPG

II. Les maladies osseuses

II. 1. Le capital osseux

Au cours de la vie, l'équilibre entre la formation et la résorption osseuse diffère, modifiant ainsi la masse osseuse (figure 1-16). En effet, l'essentiel du capital osseux est acquis durant l'enfance et l'adolescence et atteint « pic de masse osseuse » (PMO) qui va être un déterminant essentiel de la masse osseuse. Le PMO est établi par de nombreux facteurs aussi bien génétiques, hormonaux qu'environnementaux (activité physique, nutrition) et fixe le risque de fracture pour le reste de la vie.

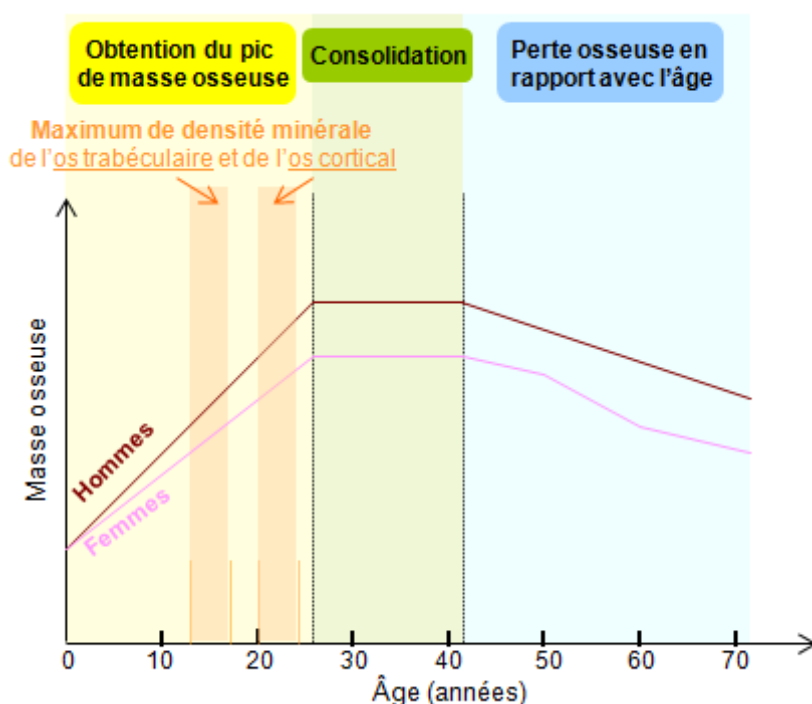


Figure 1-16
Représentation schématique
des changements de la masse
osseuse durant la vie – Adapté
de [Clunie 2009]

Cet équilibre formation-résorption ainsi que le risque de fracture sont fortement affectés par des maladies osseuses dont la plus connue est l'ostéoporose.

II. 2. Ostéoporose

II. 2. 1. Définitions

On parle d'une ostéoporose (du grec : *osteon*, os ; *poros*, pore et *osis*, condition), d'un point de vue biologique, lors d'un déséquilibre du remodelage osseux déterminé par une hyperactivité ostéoclastique et un hypofonctionnement ostéoblastique. Cette pathologie se traduit alors par une raréfaction du tissu osseux avec amincissement des travées osseuses spongieuses et corticales [Mazières 2002; Meunier 2005 b] (figure 1-17). L'ostéoporose fragilise le tissu osseux qui ne pourra plus assurer sa fonction de soutien et des fractures vont survenir.

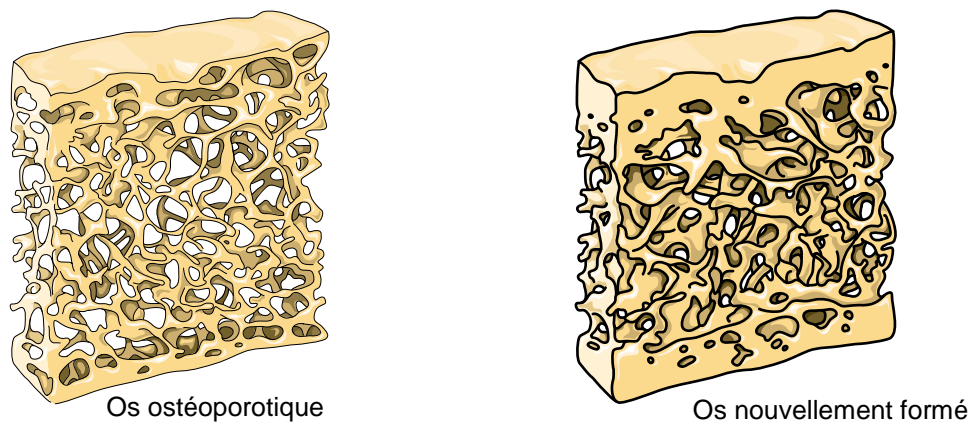


Figure 1-17 : Représentation schématique d'un os ostéoporotique et nouvellement formé
- Adapté de Servier Medical Art

L'ostéoporose est définie, d'un point de vue médical, depuis 1994, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme : « *Une maladie caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration micro-architecturale du tissu osseux, conduisant à une fragilité et, par la suite, à une augmentation du risque de fracture.* » [OMS 1994].

II. 2. 2. Différents types d'ostéoporose

On peut distinguer différents types d'ostéoporoses : l'ostéoporose « primitive » liée à l'âge et l'ostéoporose « secondaire » induite par certains traitements ou pathologies comme l'ostéoporose cortisonique par exemple. Dans le cas de l'ostéoporose liée à l'âge, ostéoporose la plus fréquente, on peut différencier deux cas : l'ostéoporose post-ménopausique, touchant l'os trabéculaire, liée à une carence en œstrogènes au cours de la ménopause et l'ostéoporose sénile, correspondant à l'atteinte de l'os cortical, en relation avec les facteurs liés au vieillissement (insuffisance en vitamine D, mauvaise adsorption du calcium).

II. 2. 3. Facteurs à risque

Selon la note de synthèse de la Haute Autorité de Santé (HAS) publiée en 2006 relative à l'ostéoporose, les facteurs à risque recensés sont nombreux et peuvent être de deux types : soit (1) inhérents à la personne : âge, sexe féminin, génétique (antécédents familiaux d'ostéoporose), ménopause et pathologies ou traitements inducteurs d'ostéoporose ; soit (2) dus à l'hygiène de vie de la personne : inactivité physique, carence vitaminocalcique, tabagisme, alcoolisme, faible poids et faible indice de masse corporelle (IMC).

Selon Orcel, les grands mécanismes pathogéniques peuvent être schématisés comme suit (figure 1-18):

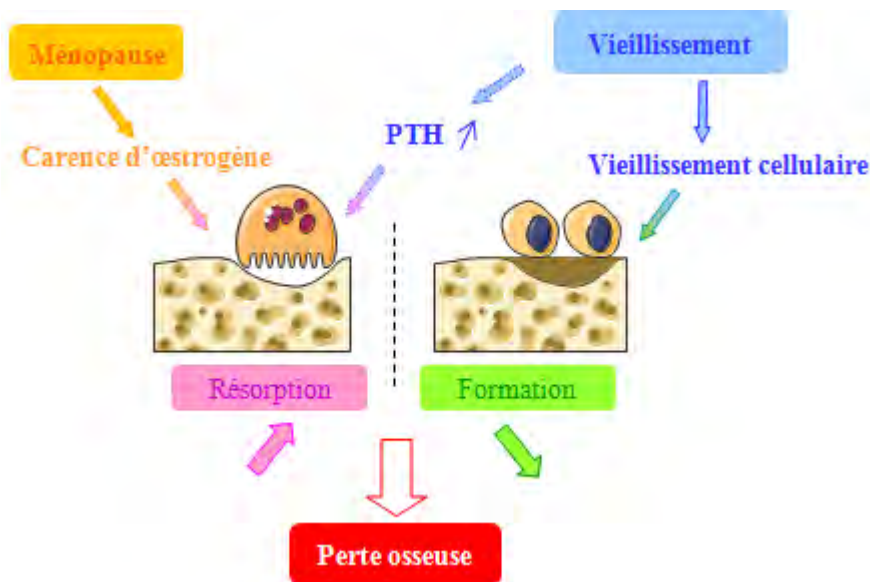


Figure 1-18:
Mécanisme pathogénique de l'ostéoporose

II. 2. 4. Diagnostic de l'ostéoporose : T-Score

L'ostéoporose est détectée par mesure de la quantité totale minérale de l'os (DMO) lors d'un examen d'ostéodensitométrie biphotonique (DXA pour *Dual Energy X-ray Absorptiometry*). La valeur de DMO, mesurée généralement à l'extrémité supérieure du fémur, correspond à la quantité de minéral par aire de la zone mesurée. Les résultats sont exprimés en T-score. Le T-score est obtenu par différence entre la DMO du patient et la DMO théorique d'un individu jeune. Selon l'OMS, sa valeur définit le diagnostic osseux du patient,

- Si $-1 \leq \text{T-score}$: la densité est normale
- Si $-2,5 \leq \text{T-score} \leq -1$: le patient est ostéopénique
- Si $\text{T-score} \leq -2,5$: le patient est ostéoporotique
- Si $\text{T-score} \leq -2,5$ accompagné d'une fracture : le patient est atteint d'ostéoporose sévère

II. 2. 5. Quelques chiffres

Le risque de fracture de la hanche, complication la plus sévère de l'ostéoporose touche une femme sur trois et un homme sur cinq âgés de plus de 50 ans dans le monde [Compston 2009; Khosla 2010]. L'accroissement et le vieillissement de la population font de l'ostéoporose un véritable enjeu de santé publique aussi bien au niveau mondial avec 9 millions de fractures ostéoporotiques annuelles dont 1,6 millions de fractures de la hanche en 2000 [Johnell *et al.* 2006] qu'au niveau national avec une augmentation de 5% du nombre de fractures de la hanche diagnostiquées annuellement d'ici 2025 (passant de 56000 à 110000) [Meunier 2005 a].

II. 3. Maladie de Paget : une autre maladie osseuse

D'autres maladies osseuses existent dont la maladie de Paget. La maladie de Paget tient son nom de Sir James Paget, chirurgien et anatomo-pathologiste britannique qui décrit au 19^e

siècle cette affection du tissu osseux. Cette maladie osseuse est la seconde ostéopathie bénigne la plus fréquente, à partir de 50 ans, loin derrière l'ostéoporose. La maladie de Paget est une affection de l'adulte fréquente lentement évolutive, souvent asymptomatique, probablement héréditaire, se caractérisant par une hyperostéoclastose suivie d'une hyperostéoblastose engendrant un remodelage osseux accéléré et excessif aboutissant à la formation d'un os mal organisé, moins solide et hypervasculaire [Alexandre *et al.* 1998; Mazières 2002; Malghem *et al.* 2005].

III. Les traitements des maladies osseuses

III. 1. Les agents thérapeutiques d'hier et d'aujourd'hui

Depuis les années 1960, les traitements de l'ostéoporose ont considérablement évolué (figure 1-19). Le traitement de l'ostéoporose, préventif ou curatif, a été dominé durant des décennies par le traitement hormonal substitutif (THS), administration combinée d'œstrogène et de progestérone inhibant la résorption osseuse. Toutefois, au jour d'aujourd'hui l'indication de ce traitement est limitée par l'AFSSAPS (*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé*) depuis 2004 suite à l'étude *Women's Health Initiative* (WHI) réalisée en 2002 remettant en cause ce traitement [Rossouw *et al.* 2002]. Cette étude a mis en évidence un rapport bénéfice/risque défavorable à long terme suite à l'observation d'une augmentation des risques cardiovasculaires (infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral) [Manson *et al.* 2003] et du cancer du sein lié au THS [Azoulay 2004]. Notons que les sels de fluor, stimulateur de formation osseuse, ont aussi été retirés du marché dans les mêmes années en raison d'un mauvais rapport bénéfice/risque.

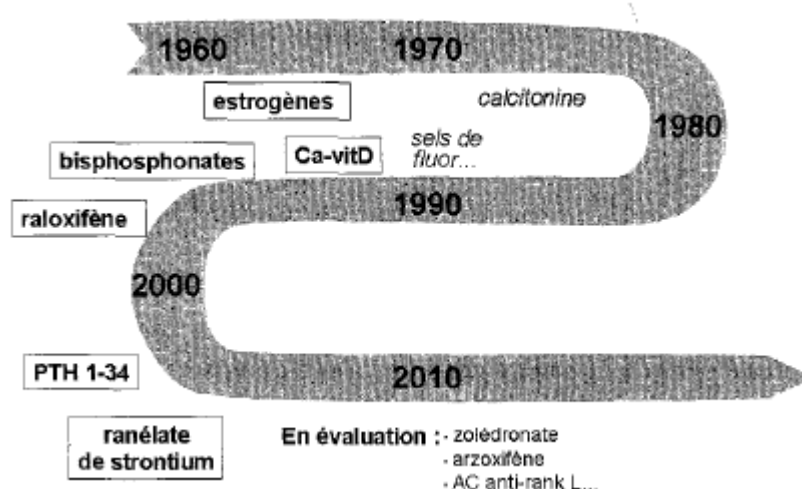


Figure 1-19: Principaux médicaments de l'ostéoporose post-ménopausique introduits depuis les années 1960 [Meunier 2005 b].

Durant cette dernière décennie l'arsenal thérapeutique s'est diversifié. Actuellement, différents agents thérapeutiques sont utilisés dans le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique, pouvant être classés selon leurs mécanismes d'action : soit (1) ils inhibent la résorption osseuse, ce sont les agents anti-résorptifs, soit (2) ils stimulent la formation osseuse, ce sont les agents ostéoformateurs, soit (3) ils combinent ces deux actions [Mazières 2002; Chapurlat *et al.* 2004; Orcel 2005; Meunier 2005 a; Malaise *et al.* 2008].

Les agents anti-résorptifs sont les plus nombreux et les plus utilisés. Ils agissent sur la différenciation des ostéoclastes en diminuant leur phase d'activation et inhibent l'activité des ostéoclastes. Actuellement, les agents anti-résorptifs prescrits à titre curatif ou préventif sont : les bisphosphonates (BPs) en chef de file, les œstrogènes, la calcitonine [Farley *et al.* 1988] et récemment les modulateurs sélectifs des récepteurs oestrogéniques (SERM) dont l'un des plus connus est le raloxifène [De Vernejoul 2000; Meunier 2005 a]. Notons qu'un nouvel inhibiteur de RANKL, le denosumab, agissant sur la voie RANK/RANKL/OPG a récemment été mis sur le marché [McClung *et al.* 2006]. L'agent ostéoformateur utilisé est la tériparatide, une parathormone (PTH) recombinante qui contrôle le métabolisme du calcium et du phosphate dans l'organisme et qui stimule la formation osseuse [Jiang *et al.* 2003] tandis que l'agent qui combine l'anti-résorption et ostéoformation récemment mis sur le marché est le ranélate de strontium [Meunier *et al.* 2004].

Les bisphosphonates, l'un des agents thérapeutiques les plus administrés pour le traitement des maladies osseuses font l'objet de notre étude, aussi nous nous attarderons à les décrire plus en détails dans le paragraphe suivant.

III. 2. Les bisphosphonates (BPs)

III. 2. 1. Historique

Les caractéristiques biologiques des bisphosphonates sont connues depuis quelques décennies. La connaissance de ces propriétés dérive d'expériences réalisées avec des pyrophosphates. Fleisch *et al.* dans les années 1970 découvrent que des composés présents dans le plasma et l'urine inhibent la précipitation des phosphates de calcium. Cette activité inhibitrice est en partie due aux pyrophosphates. Fleisch *et al.* ont donc approfondi leurs expériences et mis en évidence l'effet des pyrophosphates en tant qu'inhibiteur de la dissolution et de la formation de phosphate de calcium *in vitro* et de la calcification *in vivo* [Fleisch *et al.* 1968]. Toutefois, l'effet des pyrophosphates sur la résorption osseuse n'a pas pu être observé pour des raisons d'hydrolyse rapide du composé au milieu aqueux lors de son administration orale engendrant une application limitée dans le domaine médical pour la

scintigraphie et les dentifrices contenant des agents antitartres. Un analogue possédant les mêmes propriétés physicochimiques mais résistant à une hydrolyse enzymatique a donc été recherché. Les composés obtenus répondant à ces critères sont les bisphosphonates [Fleisch 2000].

III. 2. 2. Structure moléculaire

Les bisphosphonates (BPs) sont donc des analogues stables des pyrophosphates puisque contrairement aux pyrophosphates qui comportent une liaison P-O-P, les bisphosphonates possèdent une liaison P-C-P, les rendant résistants à une hydrolyse enzymatique (figure 1-20).

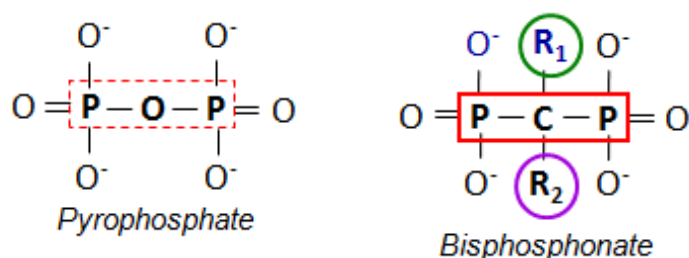
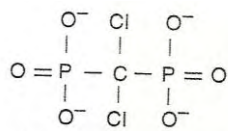


Figure 1-20 :
Structure moléculaire d'un
pyrophosphate et d'un
bisphosphonate

Les bisphosphonates (BPs) sont appelés ainsi car ils possèdent deux groupements phosphonates répartis de chaque côté du carbone central. La présence des chaînes latérales R1 et R2 respectivement responsable de l'affinité des bisphosphonates pour les cristaux d'apatites et du potentiel d'anti-résorption du bisphosphonate confère aux bisphosphonates une grande modularité (figure 1-21). Ainsi, plusieurs bisphosphonates existent possédant chacun leurs propres propriétés physicochimiques et biologiques. Toutefois deux catégories majeures de bisphosphonates peuvent être distinguées, en fonction de la présence ou non d'une fonction amine sur la chaîne R2, respectivement dénommés amino-bisphosphonates (N-BPs) ou non amino-bisphosphonates. La figure 1-22 présente quelques uns de ces bisphosphonates. Notons qu'au cours du temps, plusieurs générations de bisphosphonates se sont succédées afin d'améliorer leur potentiel d'anti-résorption tout en diminuant la posologie (figure 1-21).

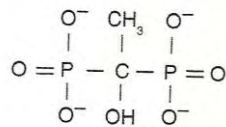
Bisphosphonate	R1	R2	Potency*
Clodronate	Cl	Cl	~10x
Etidronate	OH	CH ₃	~1x
Pamidronate	OH	(CH ₂) ₂ NH ₂	~100x
Alendronate	OH	(CH ₂) ₃ NH ₂	>100-<1000x
Neridronate	OH	(CH ₂) ₅ NH ₂	~100x
Olpadronate	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	>100-<1000x
Ibandronate	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) (CH ₂) ₄ CH ₃	>1000-<10,000x
Risedronate	OH	CH ₂ -3-pyridine	>1000-<10,000x
Zoledronate	OH	CH ₂ -imidazole	>10,000x

Figure 1-21:
Potentiel d'anti-résorption osseuse
de plusieurs bisphosphonates de
différentes générations sur un
modèle murin
[Fleisch 1998; Neves *et al.* 2002]



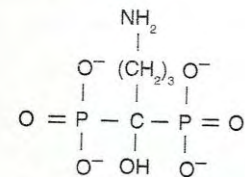
(Dichloromethylene)-
bis-phosphonate

clodronate*



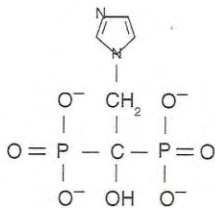
(1-Hydroxyethylidene)-
bis-phosphonate

etidronate*



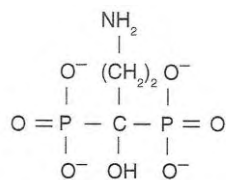
(4-Amino-1-hydroxybutylidene)-
bis-phosphonate

alendronate*



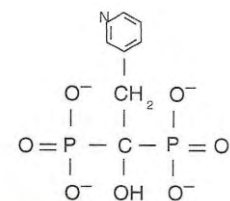
[1-Hydroxy-2-(1H-imidazole-1-yl)
ethylidene]bis-phosphonate

zoledronate



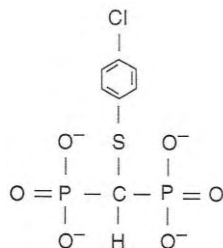
(3-Amino-1-hydroxypropylidene)
bis-phosphonate

pamidronate*



[1-Hydroxy-2-(3-pyridinyl)-
ethylidene]bis-phosphonate

risedronate*



[[4-Chlorophenyl]thio]-
methylene]bis-phosphonate

tiludronate*

Figure 1-22:
Structure moléculaire de plusieurs
bisphosphonates commercialisés
[Fleisch 2000]

Les bisphosphonates sont administrés par voie orale ou par voie intraveineuse selon la nature et l'activité de la molécule.

En dehors de l'ostéoporose, les BPs sont aussi indiqués dans le traitement de la maladie de Paget et la prévention des complications osseuses des ostéolyses malignes. Les mécanismes d'action des BPs sur les cellules tumorales ont fait l'objet d'études menées par Clézardin *et al.* [Clézardin *et al.* 2000; Clézardin 2002; Clézardin *et al.* 2003] et Orcel *et al.* [Orcel *et al.* 2002]. La figure 1-23 décrit et schématise l'effet anti-tumoral des BPs selon Orcel *et al.* [Orcel *et al.* 2002] .

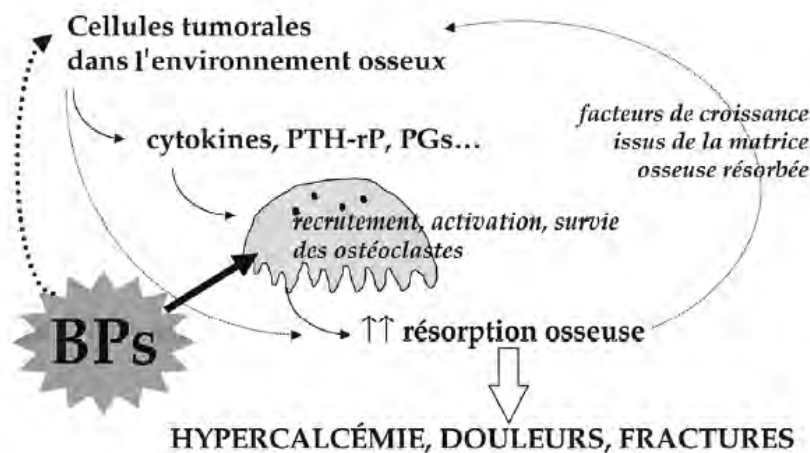


Schéma indiquant les interactions entre l'os et les cellules tumorales. Les médiateurs sécrétés dans l'environnement osseux par les cellules tumorales (cytokines...) activent les ostéoclastes et augmentent la résorption osseuse. Il en résulte d'une part une série de symptômes dus à la fragilisation osseuse, d'autre part une libération locale de facteurs de croissance matriciels qui stimulent la prolifération des cellules tumorales, entretenant un véritable cercle vicieux. Le traitement par bisphosphonate a une action puissante et validée d'inhibition de l'action des ostéoclastes et diminue par conséquent la résorption. Les bisphosphonates pourraient également agir directement sur les cellules tumorales en diminuant leur survie.

Figure 1-23: Représentation schématique de l'effet anti-tumoral des BPs selon Orcel et al. [Orcel et al. 2002]

III. 2. 3. Mécanismes d'actions

Les bisphosphonates ont à la fois des effets physicochimiques et des effets biologiques.

Les effets physicochimiques des bisphosphonates sont semblables à ceux des pyrophosphates. Ils possèdent une grande affinité pour le phosphate de calcium en phase solide, à la surface duquel ils s'adsorbent fortement. Ils inhibent la formation, ralentissent l'agrégation et la dissolution des cristaux de phosphates de calcium [Fleisch 2000]. L'utilisation des BPs en tant que marqueurs du squelette en médecine nucléaire et molécules actives pour la localisation sélective sur le minéral est basée sur leur affinité pour le minéral osseux. De la même manière, les BPs inhibent la calcification *in vivo* lors d'administration à forte dose [Fleisch 1998].

Il ne semble pas y avoir de corrélation claire entre la structure des BPs et leur activité d'antirésorption. L'affinité des BPs pour le minéral osseux est due à la structure P-C-P tandis que leur activité est influencée également par la nature des chaînes latérales. Les travaux de Shinoda *et al.* ont confirmé que le pouvoir d'anti-résorption des BPs n'est pas seulement du à leur aptitude à inhiber la croissance et la dissolution des cristaux *in vitro*, il est aussi lié à un mécanisme cellulaire [Shinoda *et al.* 1983]. Russell *et al.* ont mis en évidence que le clodronate qui a une affinité moindre pour le cristal d'hydroxyapatite que l'étidronate a pourtant une action plus puissante sur l'inhibition de la résorption osseuse, le pouvoir d'anti-résorption des BPs n'est pas uniquement du à leur affinité pour la surface du minéral osseux [Russell *et al.* 1970]. Les bisphosphonates ont donc à la fois des effets physicochimiques et des effets biologiques.

Le mécanisme d'action des BPs sur la résorption osseuse a lieu au niveau du tissu, au niveau cellulaire et au niveau moléculaire. Au niveau du tissu, l'effet prépondérant est l'inhibition de la résorption osseuse engendrant une diminution du remodelage osseux. Au niveau cellulaire, quatre mécanismes connexes existent : (1) l'inhibition du recrutement des ostéoclastes, (2) l'inhibition de l'adhésion des ostéoclastes, (3) la diminution de la durée de vie des ostéoclastes due à une apoptose précoce et (4) l'inhibition de l'activité ostéoclastique. Au niveau moléculaire, l'activité des BPs même en faible quantité suggère un mécanisme de transduction cellulaire c'est-à-dire le passage d'une information externe en interne. Deux mécanismes (figure 1-24) sont distingués entre les BPs non aminés et les N-BPs [Fleisch 2000; Russell 2007]. Les BPs non aminés se métabolisent, c'est-à-dire qu'ils s'incorporent dans l'ostéoclaste, forment des espèces non hydrolysables, des métabolites toxiques de l'adénosine triphosphate (ATP) inhibant ainsi leur fonction cellulaire jusqu'à l'apoptose et la mort des cellules. Les N-BPs ne sont quant à eux pas métabolisés mais inhibent une enzyme de la biosynthèse du mévalonate, la farnesyl pyrophosphate synthase, empêchant la prénylation et inhibant la fonction de petites protéines régulatrices responsables de l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP), Ras, Rho, Rac et Rab indispensable au processus de signalisation intracellulaire. Cette perturbation de la fonction cellulaire désorganise le cytosquelette faisant disparaître la bordure en brosse des ostéoclastes qui aboutit à leur inactivation et à leur apoptose [Van Beek *et al.* 2003].

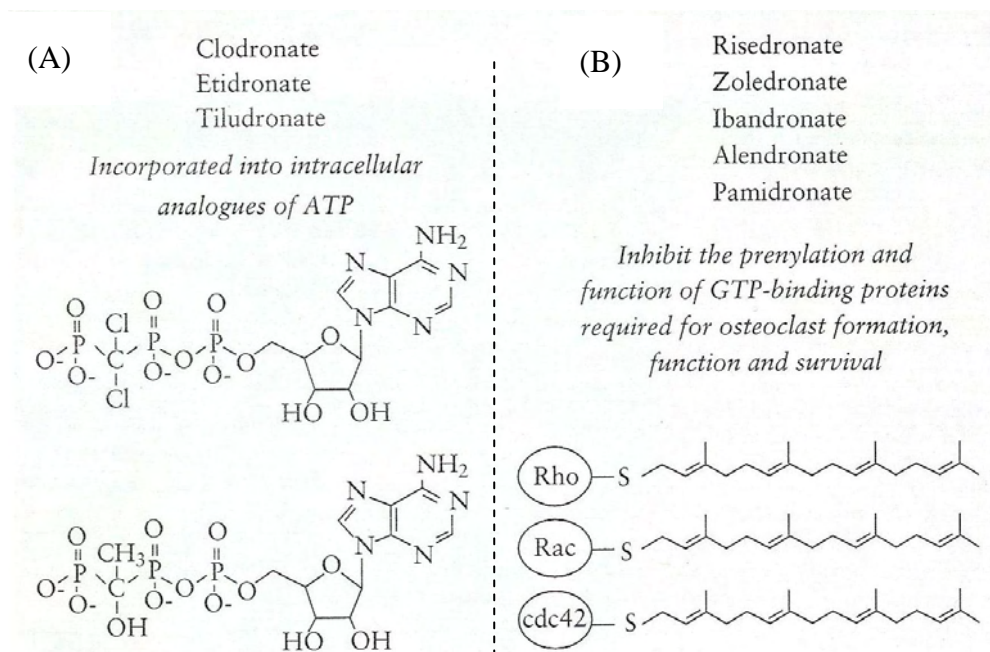


Figure 1-24: Mécanismes moléculaires de l'action des bisphosphonates non aminés (A) et aminés (B) [Fleisch 2000]

Le rôle des BPs sur d'autres cellules telles que les ostéoblastes est évoqué dans la littérature. Ce point sera détaillé dans le chapitre 3.

III. 2. 4. Un bisphosphonate : le tiludronate

Le tiludronate aussi appelé [[(4-chlorophényl)thio]-methylene]bis-phosphonate est le bisphosphonate que nous allons caractériser et adsorber sur des supports mimant le minéral osseux lors de notre étude. Le tiludronate est un non amino-bisphosphonate commercialisé sous le nom de Skelid® par le groupe pharmaceutique Sanofi en Europe et aux États-Unis pour le traitement de la maladie de Paget [McClung *et al.* 1995] sous une posologie de 400 mg/jour pendant 3 mois par voie orale. Ce médicament s'avère efficace et bien toléré par les patients [Reginster *et al.* 1988]. Notons que le tiludronate est aussi administrée par voie intraveineuse pour une application équine. Le tiludronate augmente la masse et la résistance du tissu osseux humain [Ammann *et al.* 1993; Murakami *et al.* 1994; Ohnishi *et al.* 1997].

Sa biodisponibilité, c'est-à-dire la quantité et la vitesse du passage du principe actif dans l'organisme, après administration par voie orale est très faible de l'ordre de 6% selon le dictionnaire Vidal [2011]. Selon Davi *et al.*, cette faible biodisponibilité est à relier, (1) au caractère hydrophile de cette substance active qui empêche le passage transcellulaire à travers les cellules digestives et (2) à sa complexation avec le calcium. Notons que la prise des BPs à l'heure des repas diminue significativement son absorption déjà très limitée de l'ordre 5% [Davi *et al.* 1999].

Dans le cas de l'administration du tiludronate par voie intraveineuse (i.v.) ayant une prescription équine, l'absorption est favorisée et la totalité de la biodisponibilité semble atteinte (figure 1-25). Le tiludronate n'est pas métabolisé et est excrété inchangé par les reins [2011]. Notons que l'excrétion a lieu exclusivement par voie urinaire selon deux phases. Le tiludronate est d'abord fixé rapidement dans le tissu osseux (à hauteur de la moitié de la dose adsorbée selon le dictionnaire Vidal [2011]) avec un pic au bout d'une heure tandis que l'essentiel du tiludronate plasmatique est éliminé rapidement. Notons que 70 à 90% du tiludronate qui n'est pas fixé à l'os est éliminé lors des 24 premières heures et que la dose sécrétée dans les urines sur 96 heures représente jusqu'à la moitié de la dose initialement administrée par voie intraveineuse tandis qu'après administration orale d'une dose de tiludronate [Davi *et al.* 1999], les quantités excrétées de tiludronate retrouvées au bout de 48h sont de l'ordre de $3,5 \pm 1,9\%$ selon le dictionnaire Vidal [2011]. Le tiludronate est ensuite éliminé de façon très lente pendant une longue période, correspondant au remodelage osseux avec un demi-vie de 300 jours [Davi *et al.* 1999].

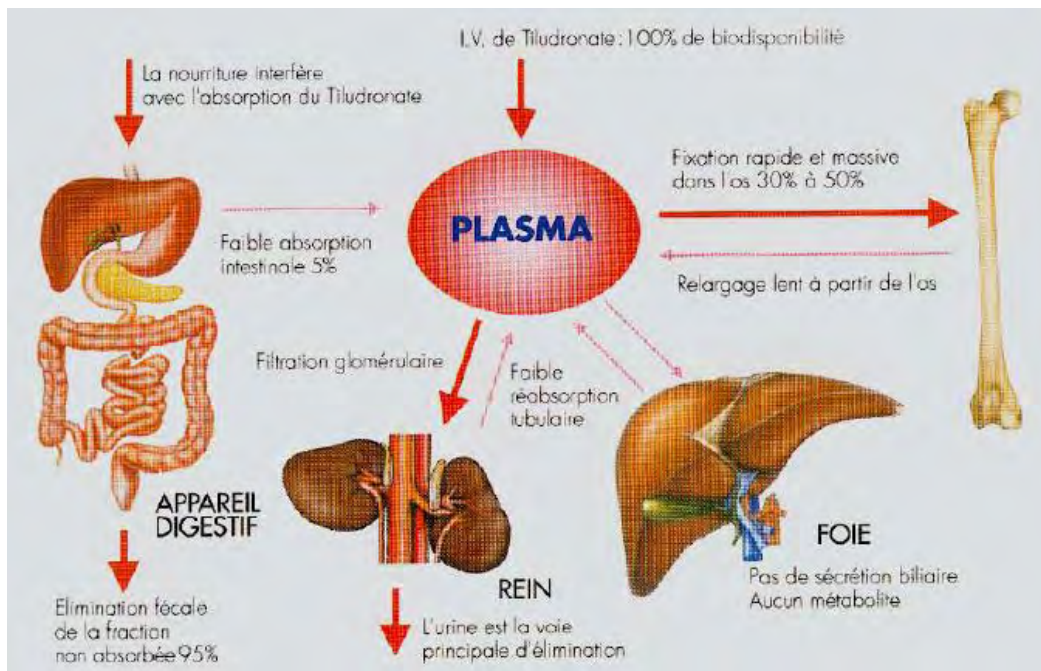


Figure 1-25: Métabolisme du tiludronate administré par voie intraveineuse [Poircuite 2004]

Chapitre 2

« Physico-chimie des apatites nanocristallines biomimétiques – Adsorption et libération de tiludronate sur des modèles du minéral osseux »

Après un paragraphe récapitulatif succinct sur les modèles d'adsorption et un état de l'art concernant l'adsorption de molécules d'intérêt biologique sur des supports apatitiques nous nous intéresserons dans un premier temps à l'élaboration et à la caractérisation physico-chimique de trois supports de phosphate de calcium apatitiques nanocristallins mal cristallisés de maturation et de teneur en carbonates différents.

Dans un second temps, nous procéderons à une adsorption sur ces apatites d'une molécule de bisphosphonate, le tiludronate, que nous aurons préalablement caractérisée. La nature du modèle de l'isotherme d'adsorption sera identifiée. L'évolution des concentrations en ions minéraux dans les solutions d'adsorption sera étudiée et les supports après adsorption seront caractérisés.

Dans un troisième temps, nous étudierons la libération des molécules de tiludronate présent dans les trois supports apatitiques biomimétiques. La cinétique de libération sera tracée et une analyse élémentaire du milieu aqueux de libération permettra de connaître l'évolution des ions calcium et phosphate.

Enfin, une discussion globale sera faite sur l'ensemble des résultats et des conclusions seront tirées.

A. Introduction bibliographique

I. Adsorption

L'adsorption est un processus intervenant lors de la fixation de molécules d'*adsorbat* (gaz ou liquide) sur une surface solide (*adsorbant*). On distingue généralement deux types de processus d'adsorption en fonction des chaleurs de réaction mises en jeu :

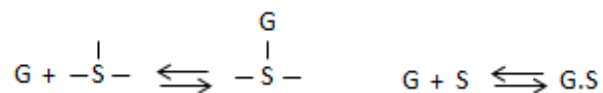
(1) La physisorption, fait intervenir des liaisons faibles de type forces de Van der Waals lors de la fixation adsorbat-adsorbant et engendre une chaleur de réaction faible (quelques kilocalories). Ces interactions vont permettre une possible adsorption en mono et multicouches. L'adsorption physique a lieu de façon rapide, sans modification de la structure des molécules physisorbées et est réversible rendant ainsi les molécules adsorbées facilement désorbables.

(2) La chimisorption, quant à elle, résulte d'une interaction chimique accompagnée de formation de liens chimiques entre les molécules d'adsorbat et la surface d'adsorbant et met en jeu une importante enthalpie de l'ordre d'une centaine de kilocalories. La fixation des molécules à la surface se faisant par liaisons de valence, ou liaison ionique. La chimisorption ne peut avoir lieu sur plusieurs couches, en principe, mais on peut imaginer une physisorption sur la surface modifiée.

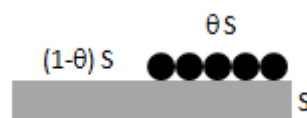
Pour un système adsorbat-adsorbant donné, les quantités adsorbées à l'équilibre pour une concentration donnée sont déterminées par des isothermes d'adsorption régies par différents modèles mathématiques. Les isothermes généralement rencontrées lors d'adsorption solution-solide [Rill09] font l'objet de ce paragraphe.

I. 1. Isotherme de Langmuir

Les réactions d'adsorption sont souvent décrites en utilisant le modèle d'adsorption de Langmuir. Ce modèle repose sur des considérations d'équilibre chimique en surface et a initialement été développé au vu de l'interprétation des réactions d'adsorption de gaz (G) sur un site superficiel d'adsorption (S) pouvant être décrit sous différentes formes :



et schématisé comme suit :



Avec: - S: surface du solide

- θ : taux de recouvrement soit l'occupation des sites

Ce n'est que plus tard qu'il sera adapté aux réactions d'adsorption à l'interface solide-liquide.

Ce modèle fait intervenir une adsorption sur une seule couche de l'adsorbant et suppose trois conditions :

- des sites d'adsorption énergétiquement équivalents,
- une seule molécule par site,
- aucune interaction entre les molécules adsorbées.

L'équation proposée pour décrire l'isotherme de Langmuir [Langmuir 1918] est :

$$Q_{ads} = N \times \frac{(K \times C_{eq})}{1 + (K \times C_{eq})} \quad (1)$$

- Avec: - C_{eq} (mmol/L): concentration d'adsorbat en solution à l'équilibre,
 - Q_{ads} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$): quantité d'adsorbat fixée par unité de surface d'adsorbant,
 - N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$): quantité adsorbée à saturation soit le nombre maximum de sites d'adsorption occupé par unité de surface,
 - K (L/mmol): constante d'affinité de l'adsorbat pour la surface de l'adsorbant.

puisque selon (A): $K = \frac{[G \cdot S]}{[G] \times [S]}$ avec $S_{\text{tot}} = [S] + [G \cdot S]$ ou $N = [S] + Q_{ads}$ et $[G] = C_{eq}$

Les paramètres d'adsorption : K et N sont déterminés à partir de la linéarisation de l'isotherme de Langmuir qui peut prendre différentes formes [Al Mardini 2008] mais nous ne nous intéresserons qu'à la forme la plus couramment utilisée à savoir :

$$\frac{C_{eq}}{Q_{ads}} = \frac{C_{eq}}{N} + \frac{1}{(K \times N)} \quad (2)$$

1.2. Isothermes Langmuir-Freundlich et Töth

Les modèles mathématiques de Langmuir-Freundlich et Töth ne sont que des modèles empiriques, inspirés du modèle de Langmuir, prenant en considération l'hétérogénéité de la surface des sites d'adsorption par le biais d'un paramètre supplémentaire n . Ainsi, ils répondent à la condition de non équivalence énergétique des sites d'adsorption en considérant une distribution gaussienne de l'énergie de surface. Les isothermes de Langmuir-Freundlich et Töth s'expriment respectivement par les relations suivantes :

$$Q_{ads} = N \times \frac{(K \times C_{eq})^n}{1 + (K \times C_{eq})^n} \quad (3) \quad Q_{ads} = N \times \left(\frac{(K \times C_{eq})}{1 + (K \times C_{eq})} \right)^{1/n} \quad (4)$$

Les paramètres caractéristiques d'adsorption K, N sont alors déterminés respectivement à partir de la linéarisation des isothermes de Langmuir-Freundlich et Töth suivantes:

$$\left(\frac{1}{Q_{ads}}\right) = \frac{1}{C_{eq}^n} \times \left(\frac{1}{(K^n \times N)}\right) + \frac{1}{N} \quad (5) \quad \left(\frac{C_{eq}}{Q_{ads}}\right)^n = (C_{eq})^n \times \frac{1}{N} + \left(\frac{1}{(K \times N)}\right)^n \quad (6)$$

I. 3. Isotherme Freundlich

L'isotherme de Freundlich s'applique généralement lorsque les quantités adsorbées sont très faibles. Ce modèle qui est un modèle empirique considère de possibles interactions entre les molécules adsorbées tout en prenant en compte l'hétérogénéité de surface (n) et s'exprime par la relation suivante :

$$Q_{ads} = K \times C_{eq}^{1/n} \quad (7)$$

Les paramètres caractéristiques d'adsorption K et n sont alors déterminés respectivement à partir de la linéarisation de l'isotherme de Freundlich suivante :

$$\log Q_{ads} = \log K + n \times \log C_{eq} \quad (8)$$

I. 4. Isotherme BET

La théorie BET, du nom de ces auteurs Brunauer, Emmett et Teller, est un modèle basé également sur l'adsorption de molécules gazeuses. Les molécules d'adsorbat sont adjacentes et recouvrent complètement l'adsorbant (Brunauer 1938), plusieurs couches sont envisagées.

La relation qui régit ce modèle est la suivante :

$$\frac{P}{v \times (P_0 - P)} = \frac{1}{v_m \times c} + \frac{c-1}{v_m \times c} \times \frac{P}{P_0} \quad (9)$$

- Avec: - P : pression à l'équilibre,
 - P_0 : pression de vapeur saturante,
 - v : volume de gaz adsorbé à la pression P ,
 - v_m : volume d'adsorbant requis pour former une monocouche complète
 - c : constante liée aux caractéristiques thermodynamiques du système gaz-solide

Ce modèle permet de connaître la quantité adsorbée sur une première couche grâce au tracé de l'isotherme d'adsorption d'une molécule gazeuse, le plus souvent l'azote. Aussi, le modèle BET est-il couramment utilisé pour déterminer la surface spécifique d'un adsorbant.

II. Adsorption de molécules d'intérêt biologiques sur des phosphate de calcium apatitiques

Depuis quelques décennies, de nombreuses recherches ont été menées sur l'adsorption de protéines, de facteurs de croissance ou de molécules actives sur différents composés phosphocalciques apatitiques. Le phosphate de calcium le plus étudié en tant que « *Drug Delivery System* » est l'hydroxyapatite stœchiométrique (HA) : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ puisqu'il existe une interaction intéressante entre les macromolécules biologiques et molécules actives et l'hydroxyapatite due aux propriétés physico-chimiques de l'hydroxyapatite et sa similitude avec le minéral osseux. Aussi, l'adsorption de molécules d'intérêt biologiques sur l'hydroxyapatite a fait l'objet de nombreuses études. Les études menées sur l'adsorption de protéines par différents auteurs mettent en évidence la grande affinité de ces molécules pour l'hydroxyapatite. L'interaction de l'albumine (BSA) avec l'hydroxyapatite en tant modèle osseux est l'une des plus référencée puisque l'albumine est la protéine la plus abondante du sang [Barroug 1989; Combes *et al.* 2002; Mavropoulos *et al.* 2011]. Kandori *et al.* [Kandori *et al.* 1992; Kandori *et al.* 2005] depuis plusieurs années ont particulièrement étudié l'adsorption de protéines dont l'albumine sur des phosphates de calcium apatitiques montrant notamment l'impact de divers ions (strontium, carbonates) [Kandori *et al.* 1993; Kandori *et al.* 1995 b; Kandori *et al.* 1995 c] et de la texture (taille et morphologie) des particules [Kandori *et al.* 1995 a; Kandori *et al.* 2002] sur l'adsorption des protéines. Les protéines telles que la catalase, la glycoprotéine, ou le lysozyme, protéine globulaire, ont fait aussi l'objet de recherche par Barroug *et al.* [Barroug *et al.* 1997; Barroug *et al.* 1998 a]. L'association de facteurs de croissance de type BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) ou VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sont aussi sujets à de nombreux articles [Midy *et al.* 2001 b; Autefage *et al.* 2009 a]. Notons que la majorité de ces études pointent du doigt le rôle des charges de surface des adsorbants et adsorbats dans leurs interactions avec les cristaux d'apatites souvent décrites comme des interactions électrostatiques [Barroug *et al.* 1989 b; Barroug *et al.* 1998 a; Midy *et al.* 2001 b].

Toutefois, bien que l'hydroxyapatite soit le biomatériau phosphocalcique le plus fréquemment utilisé, elle présente des différences notables avec le minéral osseux à la fois de réactivité, de structure et de composition et son utilisation en tant que modèle peut être remise en question. Les apatites nanocristallines biomimétiques apparaissent comme un support préférable à l'hydroxyapatite et des études comparatives, réalisées sur les deux types de phosphate de calcium, faisant l'objet d'adsorption de macromolécules d'intérêt biologiques telles que le facteur de croissance rhBMP2 [Autefage *et al.* 2009 a], l'héparine [Menbaoui *et*

al. 2004] ou des substances actives telles que la cisplatine, un anti-cancéreux [Barroug *et al.* 2004] et le risédronate, un anti-ostéoporotique [Errassifi *et al.* 2009] le confirment.

Les phosphates de calcium apatitiques nanocristallins (NCA) possèdent une plus grande capacité d'adsorption attribuée à leur grande réactivité de surface. En effet, la faible cristallinité, la taille et la morphologie des cristallites ainsi que la présence d'ions et de molécules relativement mobiles dans la couche hydratée de surface créent de nombreux sites « actifs » favorables à la « fixation » de diverses molécules [Barroug *et al.* 2004; Barroug *et al.* 2008]. De plus, les caractéristiques de cette couche labile évoluent avec la maturation et les ions présents permettant ainsi de moduler les paramètres d'adsorption en fonction des besoins et rendant ainsi ce modèle du minéral osseux « dynamique » contrairement à l'hydroxyapatite. Aussi, l'adsorption d'acides aminés, de protéines, de facteurs de croissance ou encore de molécules actives sur NCA ont fait l'objet de quelques récentes études. Barroug *et al.* ont notamment participé à l'étude et la compréhension des interactions entre ses molécules « d'origine biologiques » et NCA. Ils ont étudié l'adsorption d'acides aminés tels que la O-phospho-L-serine sur NCA et ont mis en évidence une adsorption de type Langmuir ainsi que la grande capacité d'adsorption et la grande affinité de ces acides aminés pour la surface des cristaux de NCA [Benaziz *et al.* 2001]. De plus, ils ont montré que la présence d'un groupement phosphate dans l'adsorbat favorisait l'adsorption sur NCA. Ils ont observé des interactions similaires de ces apatites avec l'héparine, l'albumine de sérum bovin (BSA) et les molécules actives de cisplatine [Ouzat *et al.* 1999; Barroug *et al.* 2004; Menbaoui *et al.* 2004]. D'autres études ont aussi été réalisées en vue d'optimiser l'adsorption de facteurs de croissance sur des céramiques phosphocalciques. Autefage *et al.* ont souligné l'impact d'un dépôt de NCA sur une céramique industrielle biphasée HA/TCP sur l'adsorption de rhBMP-2. Notons cependant que les études menées sur l'adsorption via des supports apatitiques nanocristallins restent moins abondantes que celle sur l'hydroxyapatite notamment pour des raisons de stabilité, de solubilité et de complexité du système.

Remarquons de façon générale que l'adsorption de macromolécules biologiques et des molécules actives aussi bien sur l'hydroxyapatite que sur les apatites nanocristallines semble être gouvernée par une isotherme d'adsorption de type Langmuir.

L'ostéoporose devenant un enjeu majeur de santé publique depuis quelques années, des études portant sur l'adsorption de bisphosphonates (BP), utilisés dans les traitements anti-ostéoporotiques, sur les phosphates de calcium apatitiques comme système de libération se sont développées. Dans la littérature, les bisphosphonates sont généralement associées à des céramiques phosphocalciques [Denissen *et al.* 1994; Josse *et al.* 2005; Seshima *et al.* 2006] ou des ciments phosphocalciques [Panzavolta *et al.* 2009; Schnitzler *et al.* 2011] en tant qu'implants dans le cadre de consolidation d'os ostéoporotiques et afin de palier aux effets secondaires liées à la prise par voie orale ou intraveineuse et pour améliorer la biodisponibilité du principe actif. Les implants en céramiques sont généralement élaborés à base d'hydroxyapatite ou encore à base de β TCP ou de mélange HA- β TCP ou encore à base d'apatites déficientes en calcium lorsque ce sont des implants non frittés. Les molécules de bisphosphonates sont majoritairement adsorbées sur le support par mise en contact de la poudre apatitique avec une solution de BP [Denissen *et al.* 1994; Josse *et al.* 2005; Nancollas *et al.* 2006; Seshima *et al.* 2006; Roussière *et al.* 2008; Errassifi *et al.* 2010] mais dans certains travaux, des techniques alternatives sont employées, par exemple, le bisphosphonate est incorporé lors de la précipitation phosphocalcique pendant la synthèse de l'apatite menant à des nanocristaux de composites HA-BP [Boanini *et al.* 2008], ou les implants sont élaborés en incorporant des cavités susceptible d'être remplies par des bisphosphonates [Denissen *et al.* 1994]. Dans le cas des implants à base de ciments phosphocalciques, les bisphosphonates sont principalement ajoutés dans la phase liquide lors de l'élaboration du support [Panzavolta *et al.* 2009]. Ces ciments ont l'avantage de s'adapter à la forme de la cavité osseuse à combler. L'association de ciments osseux avec des agents inhibiteurs de résorption osseuse, tels que les molécules de bisphosphonates, fait d'ailleurs l'objet de plusieurs brevets déposés tels que : WO 2000/47214 ou ceux déposés par Bouler *et al.* : WO 2003/074098 et WO 2008/098959 A1. Notons que certains autres travaux [Peter *et al.* 2005; McLeod *et al.* 2006] et brevets (CA 2508085, US 6596338, WO 2007/089794 A2) mentionnent, quant à eux, l'association de dépôt de phosphate de calcium avec des antibiotiques et des molécules actives de bisphosphonates sur des implants métalliques. Cependant, les bisphosphonates ne sont que rarement adsorbés sur des apatites nanocristallines [Palazzo *et al.* 2007; Errassifi *et al.* 2009; Errassifi *et al.* 2010] bien qu'ils miment mieux le minéral osseux et qu'ils possèdent des caractéristiques physico-chimiques et structurales intéressantes pour l'adsorption et la libération de molécules bioactives. Palazzo *et al.* [Palazzo *et al.* 2007] ont mis en évidence l'adsorption forte qui existait entre une molécule de BP, l'alendronate, et des nanocristaux d'apatite biomimétique de morphologie diverses (plaquettes et aiguilles).

Aussi, dans ce travail, nous nous sommes attachés à comprendre les mécanismes d'adsorption d'un bisphosphonate, le tiludronate, sur diverses apatites nanocristallines biomimétiques comme modèles osseux, ainsi que leur libération en milieu aqueux.

B. Synthèse et caractérisation physico-chimique des apatites biomimétiques

I. Synthèse des matériaux

La synthèse de poudres d'apatites nanocristallines biomimétiques, réside dans une technique simple et rapide de double décomposition en milieu aqueux (figure 2-1). Le principe de cette méthode consiste à verser rapidement une solution aqueuse de nitrate de calcium (A) dans une solution aqueuse contenant de l'hydrogénophosphate di-ammoniaque (et de l'hydrogencarbonate de sodium dans le cas des apatites carbonatées) (B) [Rey *et al.* 1995]. Cette synthèse a lieu à température ambiante, pH physiologique (pH=7,4) et dans les proportions suivantes : (A) une solution cationique contenant 52.2g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dissout dans 750mL d'eau désionisée et (B) une solution anionique dissout dans 1500mL d'eau désionisée comprenant, soit 120g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ soit 90g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ et 90g de NaHCO_3 dans le cas des apatites carbonatées. Le phosphate (ou carbonate) présent en excès va ainsi permettre de tamponner la solution à pH 7. Après homogénéisation de la suspension durant quelques minutes, celle-ci est laissée à « maturer » pendant le temps voulu sans agitation, dans un récipient hermétique. Le précipité ainsi obtenu est filtré puis lavé avec 2 litres d'eau désionisée. La dernière étape consistera en une lyophilisation afin d'obtenir, par sublimation de la glace, la poudre d'apatite voulue. Par mesure de précaution, la poudre sera, par la suite, conservée au congélateur afin de palier à son éventuelle évolution.

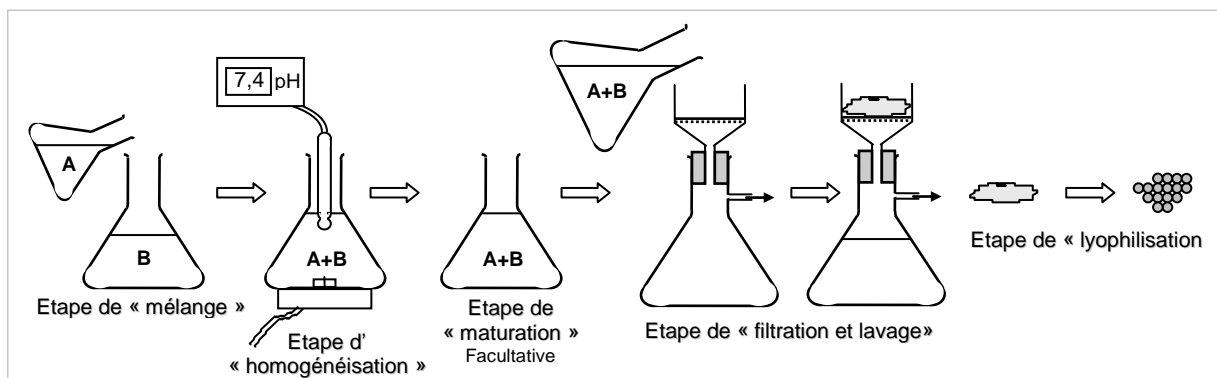


Figure 2-1 Protocole schématique de la synthèse d'apatite analogue au minéral osseux

Il est acquis que les premiers précipités d'apatite qui apparaissent lors de la formation de l'os sont métastables et pauvres en ions carbonates et qu'ils évoluent vers des cristaux plus stables enrichis en carbonates au cours de la maturation du tissu [Cazalbou *et al.* 2004 b].

Dans le cadre de cette étude, nous avons donc élaboré trois apatites biomimétiques de teneur en ions carbonates et de temps de maturation différents :

- une poudre apatitique nanocristalline non maturée et non carbonatée représentant le minéral osseux à l'état « jeune »
- une seconde poudre maturée un mois et carbonatée qui constituera l'analogue au minéral osseux à un stade « mature »
- enfin, une dernière poudre maturée un mois (sans carbonates) afin de pouvoir mettre en évidence le rôle des ions carbonates et/ou de la maturation dans ces supports.

Ces composés seront ultérieurement dénommés respectivement : NCA1, NCA2 et NCA3.

La totalité des expériences (adsorption, libération et tests *in vitro* avec deux types de cellules osseuses) a nécessité la réalisation de plusieurs synthèses (4 synthèses NCA1 et NCA2 et 2 synthèses NCA3) qui ont chacune fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique et dont nous ne noterons que les valeurs moyennées dans le paragraphe suivant.

II. Caractérisation

II. 1. Analyses chimiques : dosage des ions calcium, phosphate et carbonate

Les analyses chimiques mises en oeuvre pour caractériser les apatites biomimétiques sont effectuées après dissolution de l'apatite dans une solution acide. Les concentrations en ions calcium, phosphate et carbonate sont respectivement dosées par complexométrie avec EDTA, spectrophotométrie UV d'un complexe phosphovanadomolybdique et par coulométrie coulométrique (voir annexes). Les résultats des dosages des ions calcium, phosphate et carbonate sont exprimés en pourcentage massique et répertoriés dans le tableau 2-1 avec les rapports atomiques Ca/P et Ca/(P+C) correspondants. Ce dernier rapport est préféré pour les apatites carbonatées (où l'ion carbonate remplace les ions phosphate : apatite carbonatée de type B) car il permet d'évaluer directement leur déficience en calcium par rapport à une apatite stœchiométrique.

Noms	Carbonatation Maturation	Ca	P	CO ₃	Ca/P	Ca/(P+C)
NCA1	non carbonatée 0 jour	32,59 ± 0,29	17,96 ± 0,31	0,34 ± 0,04	1,40 ± 0,02	1,39 ± 0,02
NCA2	carbonatée 31 jours	34,43 ± 0,74	16,51 ± 0,22	5,57 ± 0,40	1,62 ± 0,02	1,38 ± 0,02
NCA3	non carbonatée 31 jours	36,82 ± 0,42	17,72 ± 0,45	0,54 ± 0,04	1,61 ± 0,02	1,59 ± 0,02

Tableau 2-1: Analyses chimiques des trois apatites nanocristallines biomimétiques synthétisées

Les apatites NCA1, NCA2 et NCA3 synthétisées sont toutes des apatites déficientes en calcium puisqu'elles présentent respectivement un rapport atomique Ca/(P+C) de 1,39, 1,38 et 1,59. Une augmentation du rapport atomique Ca/P est observée au cours de la maturation [Legros 1984; Menbaoui *et al.* 2004]. Lors de la maturation d'une apatite carbonatée, les ions phosphate vont être progressivement substitués par des ions carbonates dans le précipité [Eichert *et al.* 2008]. Il est établi que le minéral osseux mature contient 5 à 8% massique de carbonates majoritairement de type B [Penel *et al.* 1998]. Le minéral osseux jeune est, quant à lui, caractérisé par un rapport atomique Ca/(P+C) et une teneur en ions carbonate faible [Legros 1984; Rey *et al.* 1995].

La carbonatation des apatites obtenues en milieu exempt de carbonate de sodium peut être attribuée à la contamination des préparations par du CO₂ atmosphérique, au cours de la précipitation ou du lavage des échantillons qui s'effectuent sans précautions particulières à l'air. Notons toutefois que les teneurs en carbonate de ces apatites restent très faibles.

II. 2. Mesures de surface spécifique

Les surfaces spécifiques des poudres synthétisées ont été déterminées à l'aide du modèle BET (annexe) et reportés dans le tableau 2-2.

Noms	Carbonatation-Maturation	S_{BET} (m ² /g)
NCA1	non carbonatée – 0 jour	193,26 ± 2,78
NCA2	carbonatée – 31 jours	189,87 ± 4,52
NCA3	non carbonate – 31 jours	153,67 ± 4,94

Tableau 2-2: Surfaces spécifiques des poudres NCA1, NCA2 et NCA3 synthétisées.

La poudre NCA1 présente la surface spécifique la plus importante par rapport aux deux autres poudres. Dans le cas d'une maturation en présence de carbonates, la surface spécifique n'évolue pas ou très peu alors que dans le cas d'une maturation en milieu dépourvu d'ions carbonates on observe une diminution significative de la surface spécifique. Ces évolutions ont déjà été observées par Rey *et al.* [Rey *et al.* 1995] et sont à corrélérer avec une croissance cristalline. En présence de carbonates, inhibiteurs connus de la croissance cristalline des apatites, ce phénomène paraît très limité. Ainsi, les poudres synthétisées peuvent être classées: NCA1>NCA2>NCA3 en terme de surface spécifique.

II. 3. Taille et morphologie des particules

II. 3. 1. Diffraction des rayons X

Les diagrammes de diffraction des rayons X des trois apatites biomimétiques synthétisées, présentés en figure 2-2, révèlent des raies larges et mal résolues caractéristiques d'une apatite phosphocalcique de basse cristallinité analogues à la phase minérale des tissus calcifiés [Rey *et al.* 1995]. L'indexation des raies des diffractogrammes obtenus pour les trois apatites nanocristallines biomimétiques (Tableau 2-3) a été réalisée en se basant sur les raies de diffraction de l'hydroxyapatite, apatite phosphocalcique de haute cristallinité (Tableau 2-3). Néanmoins, des différences de résolution sont constatées entre les diffractogrammes. En effet, selon la littérature, la maturation améliore la résolution des raies [Rey *et al.* 1995] tandis que la présence des carbonates, [LeGeros *et al.* 1995], la diminue. Par conséquent, le diffractogramme de l'apatite NCA3 uniquement maturée présente la meilleure résolution.

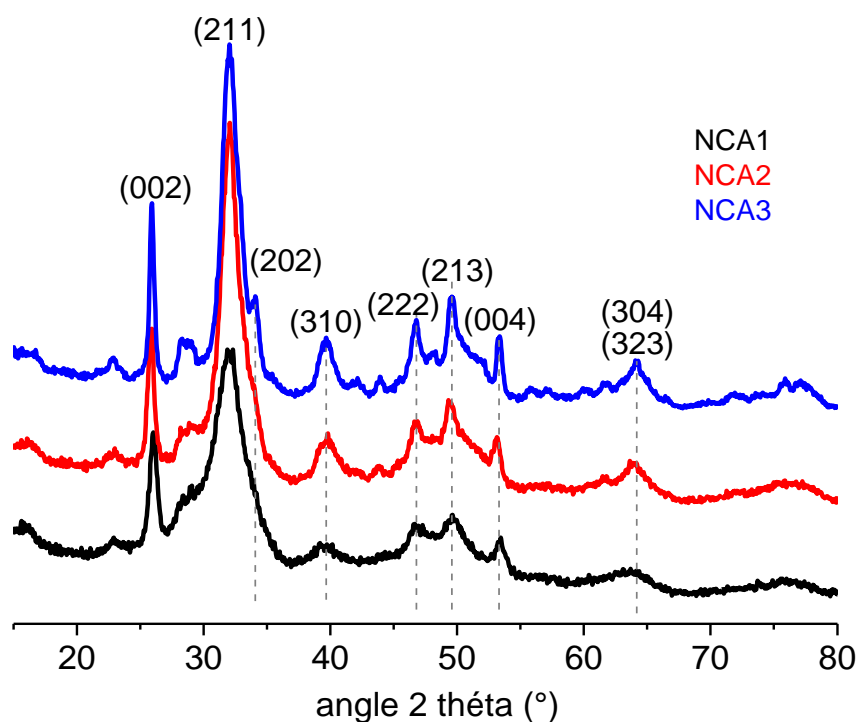


Figure 2-2: Diagrammes de diffraction des RX des trois poudres synthétisées : NCA1, NCA2 et NCA3

Angle $2\theta(^{\circ})$	I rel.	hkl .
25,900	40	002
31,799	100	211
32,222	60	112
32,929	60	300
34,076	25	202
39,852	20	310
46,751	30	222
49,510	40	213
53,189	20	004
61,715	10	214
64,136	13	304 ; 323

Tableau 2-3: Principales raies de diffraction de l'hydroxyapatite (JCPDS-ICDD 9-432)

Bien que la mauvaise résolution des raies de diffraction des rayons X des apatites biomimétiques ne rende pas possible la détermination des dimensions des paramètres de la maille de façon précise, la dimension apparente des domaines apatitiques peut, quant à elle, être estimée grâce à la mesure de la largeur à mi-hauteur des raies.

Ainsi, la taille apparente des domaines cristallins a été déterminée en appliquant la formule de Scherrer [Scherrer 1918]:

$$L_{(hkl)} = \frac{0.94 \times \lambda}{\cos \theta \times \sqrt{\beta_r^2 - \beta_0^2}} \quad (10)$$

- Avec: - $L_{(hkl)}$ (Å): taille moyenne des cristallites dans la direction perpendiculaire aux plans (hkl),
- λ : longueur d'onde (dans notre cas : $\lambda_{K\alpha1Cu} = 1,540598$ Å),
- 0,94 : constante de Scherrer,
- θ (rad) : angle de Bragg au sommet de la raie hkl considérée,
- β_0 (rad) : largeur à mi-hauteur de la raie hkl considérée d'une hydroxyapatite stœchiométrique calcinée à 900°C pendant 3h bien cristallisée,
- β_r (rad) : largeur à mi-hauteur de la raie hkl considérée sur l'échantillon étudié

Comme nous le verrons dans l'étude par microscopie électronique à transmission, les cristallites des apatites obtenues présentent une morphologie de type plaquettes (figure 2-3) analogues à celles observées par Kim *et al.* lors de l'étude d'os d'origine animale (poisson, poulet, souris et bovin) [Kim *et al.* 1995]. L'application de la formule Scherrer aux raies (002) et (310), correspondant respectivement à un système de plans réticulaires perpendiculaire à l'axe c de la maille hexagonale et parallèles à cet axe, permet une estimation des dimensions des cristallites selon l'axe c (correspondant à la plus grande dimension des nanocristaux ou longueur) : l et selon une direction perpendiculaire correspondant à la largeur-épaisseur (e) des plaquettes.

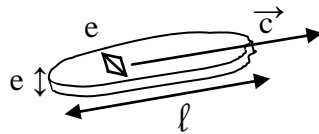


Figure 2-3: Schéma de la morphologie d'une nanoparticule d'apatite

Les tailles moyennes de cristallites pour les différents phosphate de calcium synthétisés ont été obtenues par affinement des pics de diffraction à l'aide du logiciel Jana2006 et sont répertoriées dans le tableau 2-4.

Noms	Carbonatation-Maturation	$L(002) \pm 3\text{Å}$	$L(310) \pm 3\text{Å}$
NCA1	non carbonatée – 0 jour	148	28
NCA2	carbonatée – 31 jours	167	43
NCA3	non carbonate – 31 jours	209	41

Tableau 2-4: Dimensions apparentes des cristallites pour les trois poudres synthétisées.

Les dimensions apparentes des domaines apatitiques obtenues confirment l'allongement des cristaux selon l'axe c. De plus, la maturation semble accroître la longueur de ces domaines alors que la présence des carbonates semble au contraire limiter cet accroissement. Cette tendance est en accord avec les travaux antérieurs de Eichert *et al.* [Eichert *et al.* 2008].

La formule de Scherrer suppose que la seule cause d'élargissement des raies est la taille des domaines de diffraction. Il existe cependant d'autres causes d'élargissement des raies de diffraction, notamment l'existence de microcontraintes au sein de la maille cristalline en partie liée à l'existence de lacunes et de substituants. Dans le but d'évaluer cette contribution nous avons utilisé la formule de Williamson et Hall qui permet de distinguer la contribution liée à la taille des cristallites de la contribution des microdéformations et contraintes liées à la variabilité de composition chimique et aux défauts structuraux des matériaux synthésés.

L'expression mathématique établie par Williamson et Hall (11) [Williamson *et al.* 1953] est en réalité une combinaison de l'équation de Scherrer, prenant en compte la taille des domaines diffractants, et de l'équation de Stokes et Wilson [Stokes *et al.* 1944] évaluant la contribution des contraintes pour une même famille de plans réticulaires (par exemple 001):

$$\frac{\beta^* \cos \theta}{\lambda} = \frac{1}{L_{(hkl)}} + \eta \times \frac{\sin \theta}{\lambda} \quad (11) \quad \text{Avec : } \beta^* = \sqrt{(\beta_r^2 - \beta_0^2)}$$

Avec: - β^* : largeur à mi-hauteur corrigée de la raie (hkl)
 - β : largeur à mi-hauteur mesurée de la raie (hkl)
 - β_0 : largeur à mi-hauteur de la même raie pour une hydroxyapatite stœchiométrique calcinée à 900°C pendant 3h bien cristallisée,
 - θ (rad): angle de Bragg au sommet de la raie hkl considérée
 - λ : longueur d'onde (dans notre cas : $\lambda_{K\alpha 1Cu} = 1,540598 \text{ \AA}$),
 - $L_{(hkl)}$ (Å): taille moyenne des cristallites dans la direction perpendiculaire aux plans (hkl),
 - η : contraintes, microdéformations

Cette relation a été appliquée à la famille de plans (00l) en ne considérant que les raies (002) et (004), les raies (006) n'étant pas assez intenses. La droite : $\beta^* \cos \theta / \lambda = f(\sin \theta / \lambda)$ ainsi tracée possède : une pente caractéristique de la contribution des contraintes et une ordonnée à l'origine caractéristique de la contribution de la dimension des cristaux à l'élargissement des raies, informant sur la longueur corrigée des cristaux $L(00n)$.

Les affinements des raies à l'aide du logiciel Jana 2006 sur les raies (002) et (004) ont permis de tracer les droites des différents NCA et ainsi de déterminer la longueur corrigée des cristaux : $L(00n)$ et la contribution des contraintes de microdéformations notamment : η dont les résultats sont regroupés dans le tableau 2-5.

Noms	Carbonatation-Maturation	$L(00n) \pm 3\text{ \AA}$	η
NCA1	non carbonatée - 0jour	176	0,084
NCA2	carbonatée - 31jours	218	0,007
NCA3	non carbonate - 31jours	244	0,00025

Tableau 2-5: Valeurs corrigées de la taille des cristallites pour les trois poudres synthésés.

Au cours la maturation, une amélioration de la cristallinité est notée, accompagnée d'une diminution de la contribution des contraintes alors que la présence des carbonates induit l'effet inverse.

II. 3. 2. MET

Les observations microscopiques des trois poudres : NCA1, NCA2 et NCA3 ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique en transmission (MET) (voir annexe) et sont présentées en figure 2-4. La forme « de plaquettes » allongées selon l'axe c des nanocristaux d'apatites biomimétiques observées n'est pas conforme à la symétrie hexagonale de la maille cristalline dont les deux axes a et b perpendiculaires à l'axe c sont équivalents. Ce point a été discuté par Elliott et pourrait résulter de la formation d'un précurseur de la phase apatitique [Elliott 1994].

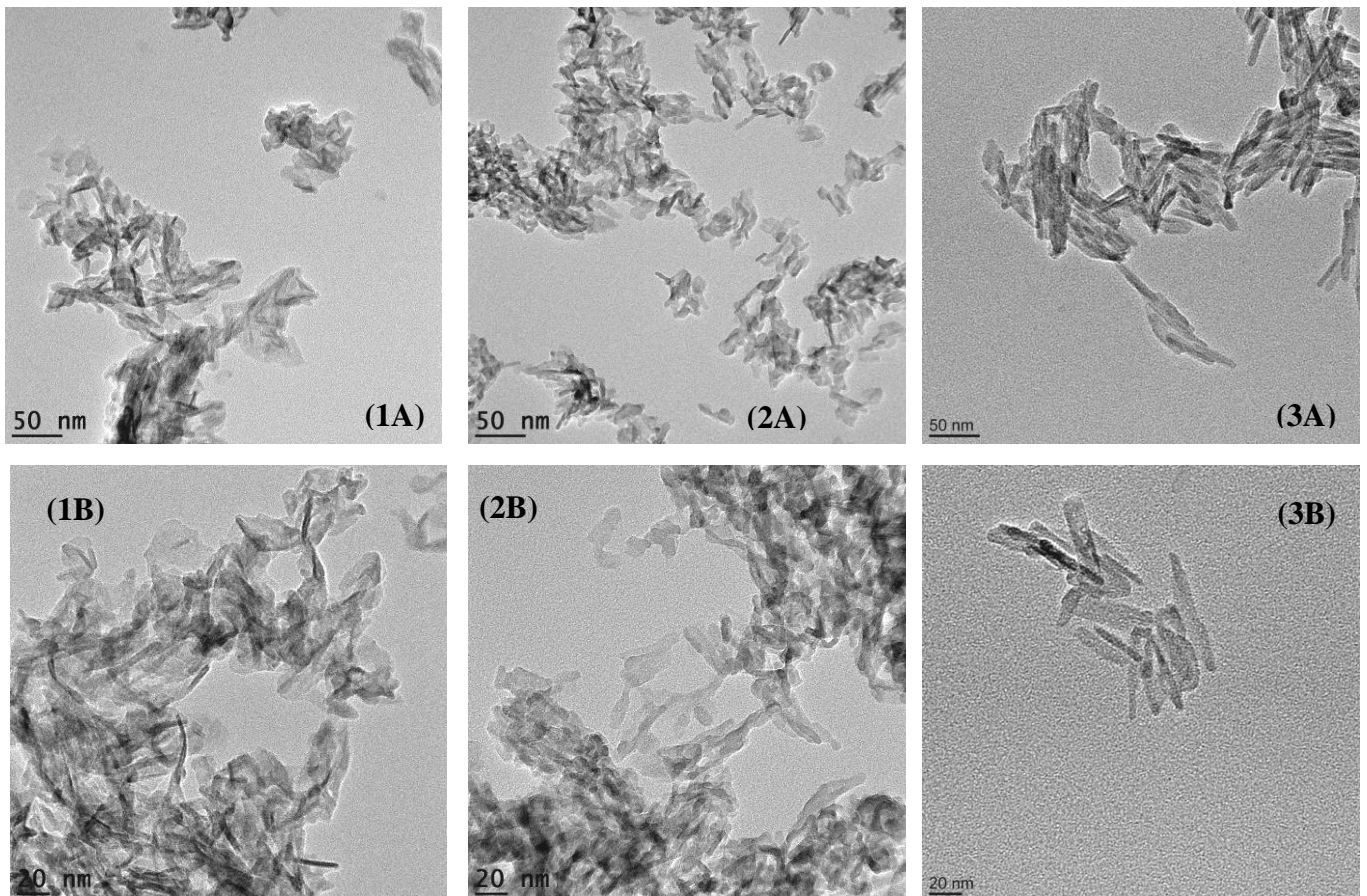


Figure 2-4: Micrographies des apatites NCA1 (1A-1B), NCA2 (2A-2B) et NCA3 (3A-3B).

De manière générale, les particules sont plus développées dans le sens de la longueur. La longueur et l'épaisseur de ces plaquettes semblent croître avec la maturation, bien qu'elles restent difficiles à déterminer en raison de l'état d'agglomération. Les dimensions relevées sont présentées dans le tableau 2-6. Ces évaluations paraissent supérieures à celles obtenues lors l'étude par diffraction des rayons X. En effet, le traitement selon la méthode de Scherrer néglige les élargissements de raies de diffraction liés aux contraintes intracristallines et

conduit à des tailles de cristaux sous évaluées [Cazalbou 2000]. Le traitement selon la méthode de Williamson et Hall prend en compte l'existence de ces contraintes et fournit des résultats plus proches de ceux obtenus par microscopie électronique en transmission.

<i>Noms</i>	<i>Carbonatation-Maturation</i>	<i>Longueur (nm)</i>	<i>Épaisseur (nm)</i>
NCA1	non carbonatée – 0 jour	27	3
NCA2	carbonatée – 31 jours	35	4
NCA3	non carbonate – 31 jours	33	4

Tableau 2-6: Tailles apparentes des particules de NCA1, NCA2 et NCA3

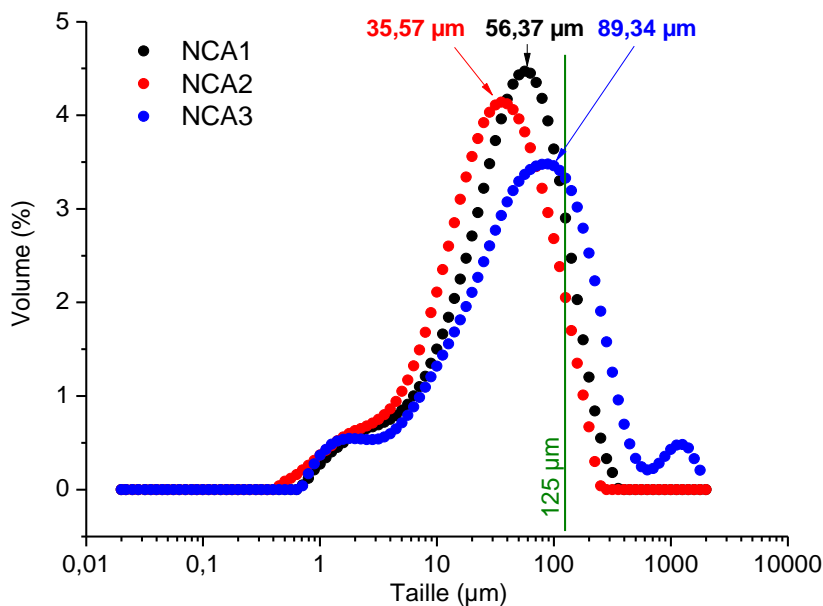
Toutefois les domaines cristallins peuvent être inférieurs à la taille apparente des particules observés en MET en raison de l'existence de la couche hydratée [Jäger *et al.* 2006]. Par ailleurs, d'autres causes d'élargissement des raies de diffraction ne sont pas actuellement prise en compte dans les différents traitements, notamment les hétérogénéités de composition entre domaines cristallins, conduisant à des variations de dimension de maille cristalline. Enfin des déformations de ces plaquettes très minces peuvent exister (comme on peut le voir par exemple sur la figure 2-4 1B) et la courbure des domaines cristallins n'est pas non plus considérée.

Selon l'orientation des plaquettes, la forme de la particule observée diffère. En effet, sur les micrographies, des particules en forme d'aiguilles (figure 2-4) sont observées correspondant à la « tranche » plus dense de la plaquette pour NCA1 et NCA2, par contre dans le cas de NCA3 la morphologie semble s'être modifiée et les cristaux adoptent une forme grossièrement aciculaire plus habituelle pour les apatites.

II. 3. 3. Analyses granulométriques

La répartition granulométrique des trois poudres synthétisées obtenue par granulométrie laser en voie sèche est présentée en figure 2-5. Le mode opératoire est décrit en annexe. Les tailles obtenues correspondent à des agglomérats et non à des tailles de particules. Cependant, la distribution « granulométrique » des trois poudres observée (tableau 2-7) est monomodale (NCA1 : 56,37 μm ; NCA2 : 35,57 μm ; NCA3 : 89,34 μm) avec la présence de fins « agglomérats » en faibles quantités en volume. Notons que la poudre NCA3 affiche en plus l'existence de gros agglomérats en faibles quantités (volume %).

Les poudres ont subi un tamisage à 125 μm de manière à éliminer les plus gros agglomérats en vue d'une adsorption de principe actif mieux contrôlée et plus répétable.



Noms	$d(0,1)$ μm	$d(0,5)$ μm	$d(0,9)$ μm
NCA1	5,54	39,10	122,05
NCA2	4,40	27,98	98,00
NCA3	6,88	60,47	265,06

Tableau 2-7: Répartition granulométrique des particules

Figure 2-5: Distribution granulométrique des trois poudres synthétisées

II. 4. Analyses spectroscopiques

II. 4. 1. FTIR

Les spectres FTIR des échantillons NCA1, NCA2 et NCA3 ont été réalisés (voir annexe) sont présentés en Figure 2-6. Ils ont subi une correction de la ligne de base et une normalisation du pic d'absorbance de la bande $\nu_4\text{PO}_4$ (600 cm^{-1}) nécessaires à la comparaison [Rey *et al.* 1989].

- Les bandes d'absorption observées sont principalement dues aux groupements phosphate apatitiques (Tableau 2-8). Les bandes multiples situées entre 1006 cm^{-1} et 1104 cm^{-1} correspondent au mode ν_3 d'élongation antisymétrique et celle observée à 962 cm^{-1} au mode d'élongation symétrique ν_1 (Figure 2-6 B2). Les déformations angulaires des PO_4^{3-} induisent quant à elles des bandes d'absorption entre 562 et 617 cm^{-1} (ν_4) et à 469 cm^{-1} (ν_2) (Figure 2-6 B3).
- Les groupements hydrogénophosphate apatitiques sont quant à eux identifiés à 551 cm^{-1} , 870 cm^{-1} (élongation de P-OH) et 1144 cm^{-1} . La présence de ces groupements témoigne de la non stœchiométrie.
- Ces spectres comportent aussi les bandes d'absorption des liaisons C-O des carbonates à $866\text{-}880\text{ cm}^{-1}$ (ν_2) (Figure 2-6 B2) et à $1420\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ (ν_3) (Tableau 2-8) à différentes intensités selon l'apport ou non de NaHCO_3 lors de la synthèse (Figure 2-6 B1) et à différents nombres d'ondes en fonction du type de la carbonatation (type A ou B) à savoir $\nu_1\text{CO}_3$ type B à 1071 cm^{-1} et $\nu_1\text{CO}_3$ type A à 1103 cm^{-1} . Ainsi, Le

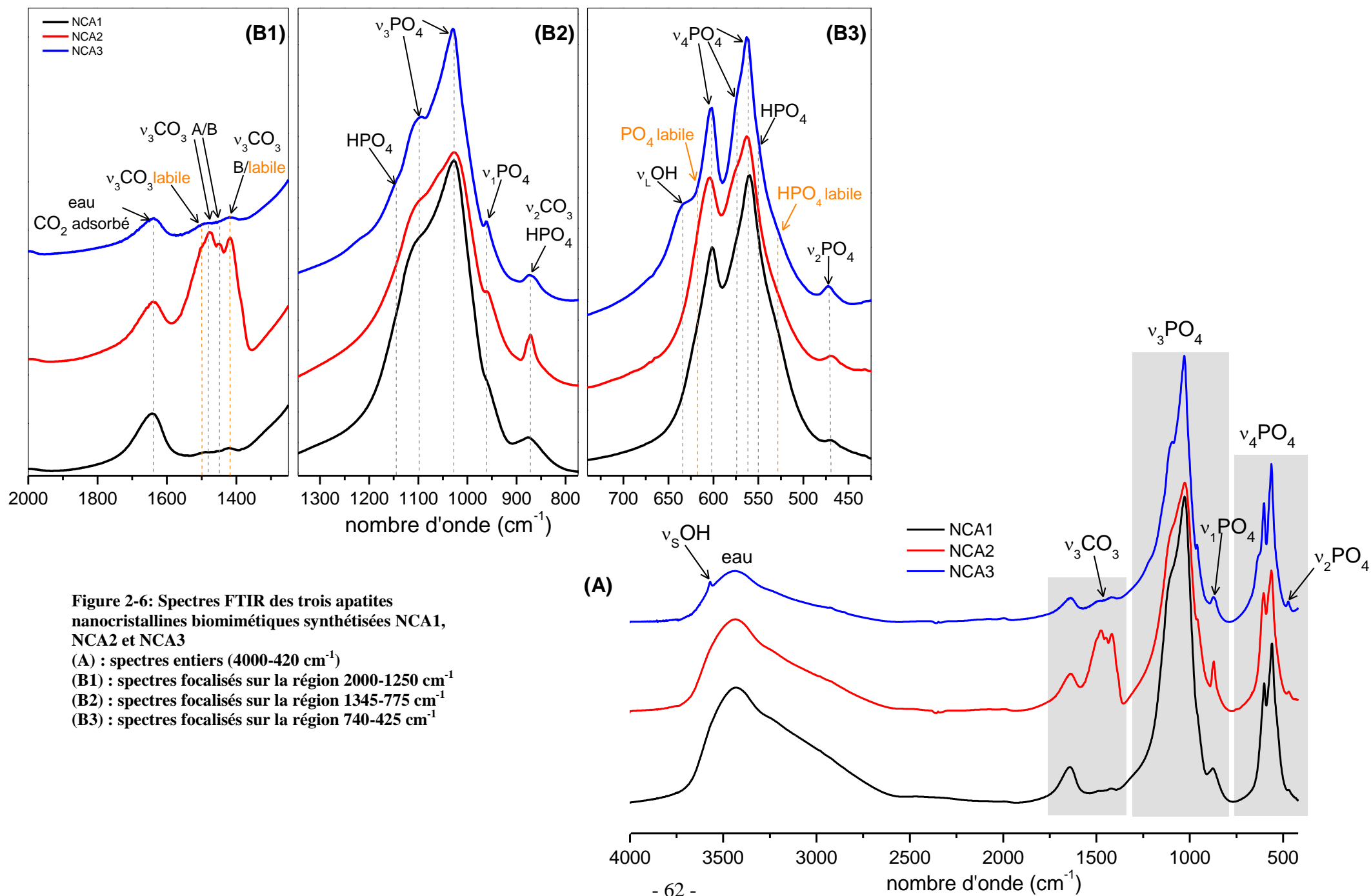
spectre du composé NCA2, carbonatée, présente, sans surprise, des bandes d'adsorption assignées aux carbonates bien plus intenses que celles des autres apatites de cette étude.

Une diminution de l'épaule à 1144 cm^{-1} (HPO_4^{2-}) du composé NCA2 par rapport à son homologue sans carbonate (NCA3) est aussi observée, traduisant la substitution d'ions HPO_4^{2-} par les ions carbonates [Menbaoui *et al.* 2004]. De plus, la présence des *bandes d'absorption des ions OH* vers 630 cm^{-1} et 3570 cm^{-1} correspondant respectivement à leur mode de libration (ν_L) et d'élongation (*stretching* : ν_S) sur le spectre de NCA3 sont signe de la tendance du composé à progressivement évoluer vers la stœchiométrie sous l'effet de la maturation.

Attribution	Nombre d'onde (cm^{-1})
$\nu_2\text{PO}_4$	469
HPO_4 labile	533
HPO_4 apatitique	551
$\nu_4\text{PO}_4$ déformation antisymétrique des ions PO_4^{3-}	562, 575, 603
PO_4 labile	617
$\nu_L\text{OH}$ vibration des ions OH	633
HPO_4 élongation de P-OH	873
$\nu_2\text{CO}_3$ labile	866
type B	871
type A	880
$\nu_1\text{PO}_4$	962
$\nu_3\text{PO}_4$ élongation asymétrique des ions PO_4^{3-}	1006, 1020, 1031, 1044, 1059, 1072, 1091, 1104
HPO_4	1144
$\nu_1\text{CO}_3$ type B	1071
type A	1103
$\nu_3\text{CO}_3$ labile et type B	1420
type A et B	1460-1470
labile	1500
type A	1540

Tableau 2-8: Attributions des bandes d'adsorption observées pour des apatites nanocristallines biomimétiques [Eichert *et al.* 2008]

En outre, les apatites nanocristallines biomimétiques synthétisées possédant une couche structurée hydratée à la surface (*couche labile*), des bandes d'adsorption des groupements phosphate, hydrogénophosphate et carbonates dites « labiles » vont être observées [Rey *et al.* 1989].



Afin de déterminer l'évolution de ces bandes, un traitement mathématique de décomposition, selon la méthode décrite par Rey *et al.* [Rey *et al.* 1990], de la région 740-425 cm^{-1} (figure 2-6, B3) comportant les bandes d'absorption ν_4 et ν_2 des groupements phosphate s'impose.

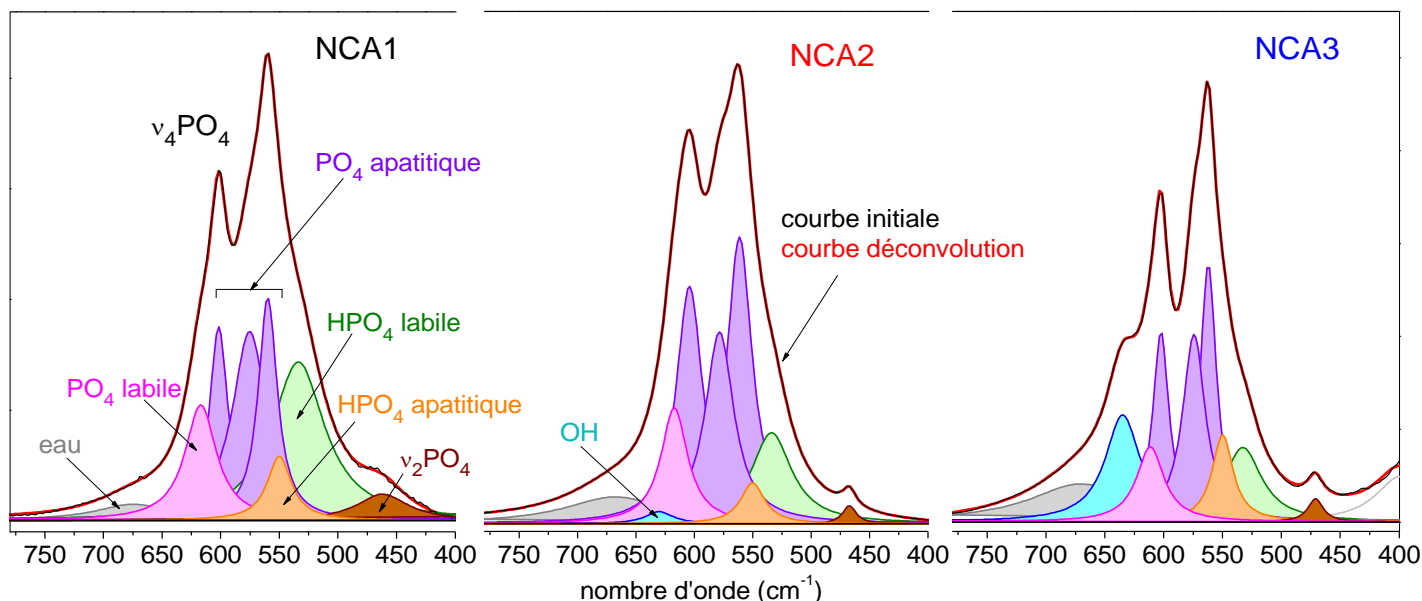


Figure 2-7: Décompositions des bandes d'absorption ν_4 et ν_2 des groupements phosphate des trois composés synthétisés

Ainsi, les décompositions des bandes IR à l'aide du logiciel *Grams/386, Galactica* (figure 2-7) ont permis d'estimer quantitativement l'aire et l'intensité relative des différentes bandes attribuées aux divers groupements apatitiques et labiles. La forme des bandes est considérée lorentzienne, la ligne de base linéaire et certains paramètres (positions des raies, largeurs) ont été fixés et modulés. L'intensité relative des bandes est définie comme le rapport de l'aire de la bande considérée sur l'aire totale de toutes les bandes assignées aux groupements phosphate dans ce domaine. La figure 2-8 rend compte des intensités relatives de bandes correspondantes aux ions labiles, apatitiques et hydroxyde présents pour les trois composés.

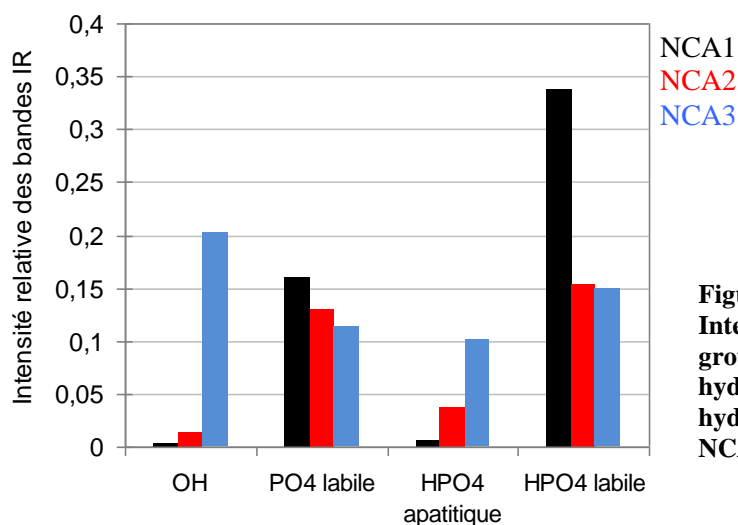


Figure 2-8: Intensités relatives des bandes IR des groupements (hydrogène)phosphate labile, hydrogénophosphate apatitique et hydroxyde des trois composés NCA1, NCA2 et NCA3

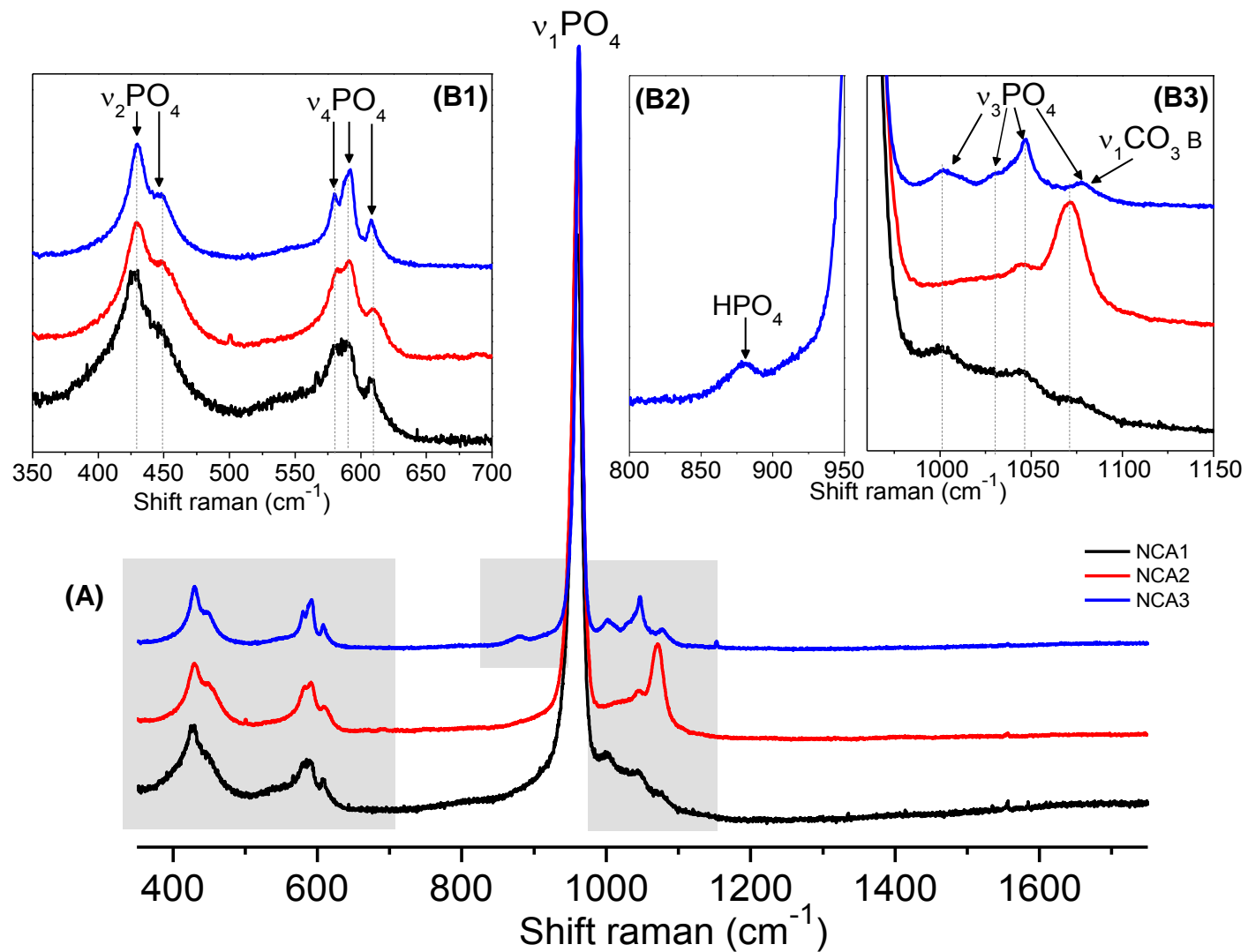
Trois tendances sont observées lors de la maturation : (1) diminution des groupements phosphate et hydrogénophosphate labiles, (2) augmentation des groupements hydrogénophosphate apatitiques et (3) incorporation des ions OH⁻ dans la couche apatitique. La présence des carbonates s'accompagne de la diminution des hydrogénophosphates labiles et de l'intensité des bandes OH⁻ par rapport à l'apatite NCA3 préparée sans addition de carbonates. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études mettant en exergue l'influence de la maturation en présence ou non d'ions carbonates sur des apatites nanocristallines synthétisées en analogie au minéral osseux [Rey *et al.* 1995]. Une apatite non carbonatée et non maturée (NCA1) possède une quantité importante d'ions (hydrogéo)phosphate labiles et une absence d'ions hydroxyles en analogie aux premiers cristaux formés sur les tissus biologiques [Legros *et al.* 1986]. Une apatite maturée carbonatée (NCA2) est plus pauvre en ions (hydrogéo)phosphate labiles et contient une quantité très faible d'ions hydroxyde analogue au minéral osseux mature. Tandis qu'une apatite maturée en l'absence de carbonates (NCA3) dispose, elle, d'une teneur en ions OH⁻ importante présentant des similitudes avec un émail dentaire mature.

II. 4. 2. RAMAN

Les spectres Raman des échantillons NCA1, NCA2 et NCA3 ont été réalisés (voir annexe) et sont présentés en figure 2-9. Ils ont subi une normalisation de la bande vibrationnelle $\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1}) et les artefacts liés aux rayonnements parasites ont été corrigés en vue de leur comparaison.

Cette autre technique spectroscopique, complémentaire à la FTIR, met elle aussi en évidence les groupements caractéristiques des NCA observés par Penel *et al.* [Penel *et al.* 1998] :

- Les groupements phosphate apatitiques (tableau 2-9) définis selon quatre régions spectrales : $432\text{-}452\text{ cm}^{-1}$ (ν_2), $584\text{-}611\text{ cm}^{-1}$ (ν_4), $1005\text{-}1071\text{ cm}^{-1}$ (ν_3), à 961 cm^{-1} (ν_1).
- Les groupements hydrogénophosphate apatitiques identifiés à 873 cm^{-1} (élongation de P-OH) et à 1004 cm^{-1} pour l'apatite NCA3.
- Les bandes d'absorption des liaisons C-O des carbonates (ν_1) à 1071 cm^{-1} et 1103 cm^{-1} attribuées respectivement aux carbonates de type A et B sur le spectre du composé NCA2 carbonatée.



Attribution [Eichert07]	Raman (cm^{-1})
$\nu_2\text{PO}_4$	432 452
$\nu_4\text{PO}_4$	584 590 611
P-OH, HPO_4	1004 873
$\nu_1\text{PO}_4$	961
$\nu_3\text{PO}_4$	1005 1032 1044 1071
$\nu_1\text{CO}_3$ type B type A	1071 1103

Tableau 2-9: Attributions des bandes Raman observées pour des apatites nanocrystallines biomimétiques [Penel *et al.* 1998; Eichert *et al.* 2008]

Figure 2-9: Spectres Raman des trois apatites nanocrystallines biomimétiques synthétisées NCA1, NCA2 et NCA3
 (A) : spectres entiers ($350\text{-}1750\text{cm}^{-1}$)
 (B1) : spectres focalisés sur la région $350\text{-}700\text{cm}^{-1}$
 (B2) : spectres focalisés sur la région $800\text{-}950\text{cm}^{-1}$
 (B3) : spectres focalisés sur la région $960\text{-}1150\text{cm}^{-1}$

De plus, nous observons la présence de deux bandes supplémentaires à 909 cm^{-1} et à 954 cm^{-1} en plus de la bande à 961 cm^{-1} , sous cette bande de $\nu_1\text{PO}_4$, attribuable respectivement aux groupements hydrogénophosphate apatitiques et aux groupements phosphate apatitiques (ν_1). Une bande autour de 920 cm^{-1} a déjà été observée par Sauer *et al.* [Sauer *et al.* 1994] est assignée aux groupements hydrogénophosphate dans un environnement de l'OCP.

Remarquons sur le spectre Raman du composé NCA3, la présence des bandes distinctes à 873 cm^{-1} et 1003 cm^{-1} attribuées aux HPO_4 d'après la littérature et en accord avec les résultats précédemment observés par FTIR. Notons, en accord avec les travaux de Penel *et al.*, que le domaine de $\nu_3\text{PO}_4$, compris entre 1000 cm^{-1} et 1070 cm^{-1} est le plus touché par les substitutions des ions carbonates dans l'apatite. Penel *et al.* ont aussi remarqué une augmentation de la bande à 1071 cm^{-1} avec la concentration en carbonates et ont de plus précisé que la majeure partie de l'intensité est due aux ions carbonates contenus dans une apatite comprenant plus de 4% de carbonates de type B [Penel *et al.* 1998].

II. 4. 3. RMN du solide

La figure 2-10 présente les spectres RMN ^{31}P et $^1\text{H}\rightarrow^{31}\text{P}$ CP (polarisation croisée) MAS à deux temps de contact τ : 0,1ms et 3 ms des trois apatites nanocristallines synthétisées. Les paramètres d'acquisition sont exposés en annexe. Les spectres montrent des similitudes entre eux. En effet, tous les spectres sont constitués d'un seul pic dissymétrique centré autour de 3 ppm. Les spectres RMN du phosphore du composé NCA1 (non mûré et non carbonaté) présentent uniquement ce large pic avec la dissymétrie plus importante. Les spectres RMN du phosphore du composé NCA2 (mûré et carbonaté) montrent des épaulements moins nets et une dissymétrie plus marquée en CP MAS par rapport au spectre ^{31}P (SPE). Le composé NCA3 (mûré et non carbonaté) affiche un pic plus fin et deux épaulements à droite et à gauche du pic intense central. Pour les spectres ^{31}P obtenus par CP, les deux épaulements sont exaltés par rapport au pic central en comparaison avec le spectre du phosphore en impulsion unique (SPE).

Dans la littérature, le pic le plus intense dissymétrique est également observé sur le minéral osseux entre 2 et 3 ppm [Mukherjee *et al.* 2008; Ironside *et al.* 2010] et sur l'hydroxyapatite 2,8-3,1 ppm [Grossmann *et al.* 2000; Wu *et al.* 2003] et est assigné aux (ortho)phosphate du minéral osseux ou aux phosphate présents dans un environnement amorphe [Belton *et al.* 1988]. La largeur du pied de la bande est due au caractère nanocristallin des apatites [Jäger *et al.* 2006]. La dissymétrie de ce pic vers les bas champs témoigne de l'existence de divers types de phosphores attribués aux ions

HPO_4^{2-} et aux groupements PO_4 puisque les spectres ont été obtenus par rotation à l'angle magique (MAS), supprimant ainsi l'anisotropie de déplacement chimique [Errassifi 2011].

Notons que contrairement à la spectroscopie IR, la technique de RMN du solide ne permet pas de différencier les $(\text{H})\text{PO}_4$ labiles des apatitiques. La largeur des deux épaulements attribués aux HPO_4^{2-} exaltés dans le composé NCA3, correspond probablement à une seule et même raie large de faible intensité. Les spectres RMN du phosphore montrent bien les différences de teneur en HPO_4^{2-} en accord avec les résultats obtenus par spectroscopie. De plus, la meilleure résolution du spectre RMN du composé NCA3 illustre l'influence de la maturation sur la cristallinité. Toutefois, ce phénomène est moins apparent sur la poudre NCA2 car la carbonatation engendre un élargissement significatif des bandes.

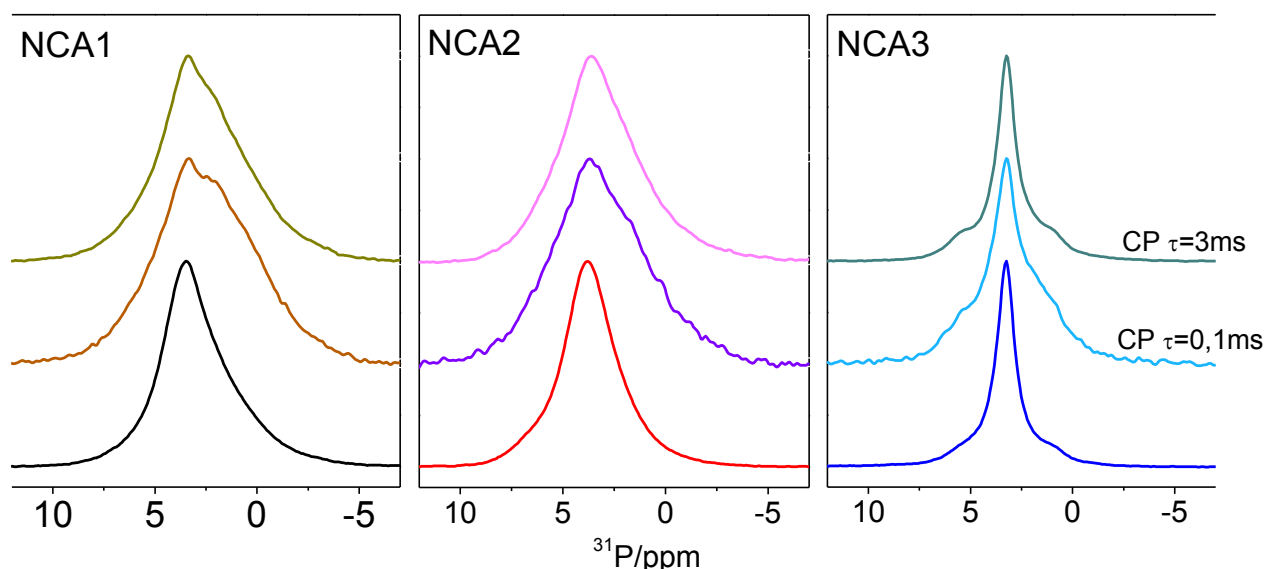


Figure 2-10 : Spectres RMN ^{31}P MAS des apatites nanocristallines : NCA1 NCA2 et NCA3

Les spectres RMN du proton des composés NCA1, NCA2 et NCA3, exposés en figure 2-11, possèdent un pic principal à 5 ppm et un pic plus ou moins intense à 0,2 ppm selon le composé. Le composé NCA1 présente en plus un large épaulement à 12-14 ppm. De plus, des pics très fins apparaissent autour de 1 ppm. Les études menées par Eichert *et al.* [Eichert 2001] et Jäger *et al.* [Jäger *et al.* 2006] par RMN du solide sur des apatites nanocristallines montrent les mêmes allures. En effet, ils observent un pic à 5,5-5,6 ppm assigné à l'eau structurale et/ou adsorbée dont la largeur est attribuée à sa délocalisation [Yesinowski *et al.* 1987], un pic à -0,1 - -0,2 ppm, signature de l'hydroxyapatite, caractéristique des hydroxyyles du tunnel apatitique, et un large épaulement à 10-14 ppm correspondant aux protons acides (HPO_4) [Yesinowski *et al.* 1987]. Des pics très fins à 1-1,5 ppm ont aussi observées. Au vu de l'absence de corrélation entre ses signaux de protons et ceux du phosphore, la présence de ces pics ne peut pas être due à l'apatite elle-même.

Ces pics ont déjà été observés à plusieurs reprises dans des articles [Yesinowski *et al.* 1987; Rodrigues 1998; Jäger *et al.* 2006; Wang 2012] et restent non systématiques et mal interprétés. Ils font d'ailleurs l'objet de discussions dans la littérature et leur attribution est controversée. Jäger *et al.* attribuent ces pics à de l'eau mobile de surface [Jäger *et al.* 2006]. D'après Yesinowski *et al.* la position de ces pics vers les champs forts provient de la grande distance O-O existante entre les molécules d'eau [Yesinowski *et al.* 1987]. Rodrigues *et al.*, en s'appuyant notamment sur les attributions de Yesinowski, assignent ce pic à des molécules d'eau isolées synonyme d'une interaction moindre entre les molécules d'eau [Rodrigues 1998]. Au vu de l'absence de corrélation entre ses signaux de protons et ceux du phosphore, la présence de ces pics ne peut pas être due à l'apatite elle-même.

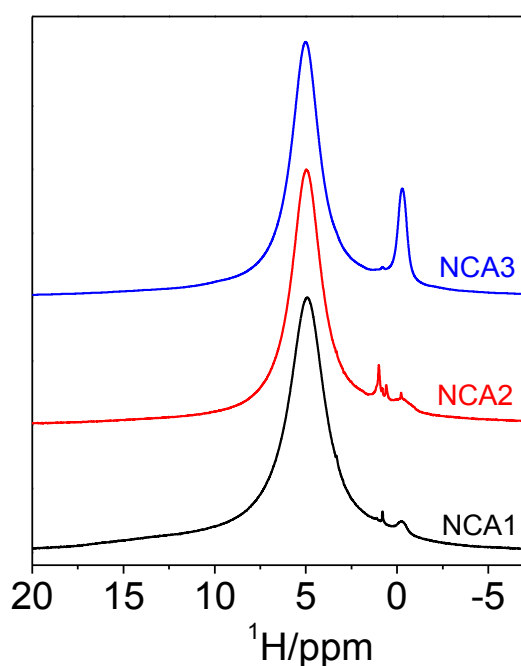


Figure 2-11 : Spectres RMN du proton des apatites nanocristallines synthétisées NCA1, NCA2 et NCA3

C. Adsorption et libération de molécules de tiludronate sur des apatites biomimétiques

I. Adsorption

I. 1. Principe actif : tiludronate disodique hémihydraté

Le tiludronate disodique hémihydraté aussi appelé [[(4-chlorophényl)thio]-methylene]bis-phosphonate dont la formule chimique est présentée en figure 2-12 possède une chaîne R1 constituée d'un hydrogène et une chaîne R2 composée d'un cycle aromatique lié à un chlore et un soufre d'où l'appellation « [(4-chlorophényl)thio] ». Ce principe actif nous a été fourni par la société Sanofi et fera l'objet de l'étude d'adsorption sur les NCA qui va suivre et sera aussi appelé tiludronate.

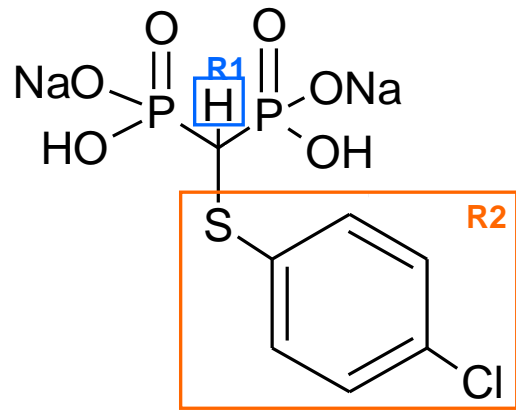


Figure 2-12: Structure moléculaire du tiludronate disodique hémihydraté

I. 1. 1. Caractérisation du principe actif

Des analyses spectroscopiques ont été menées sur le tiludronate disodique hémihydraté afin de mieux caractériser ce principe actif.

I. 1. 1. a. Equilibres de dissociation

Les équilibres de dissociation du tiludronate (Merck Index) sont présentés en figure 2-13.

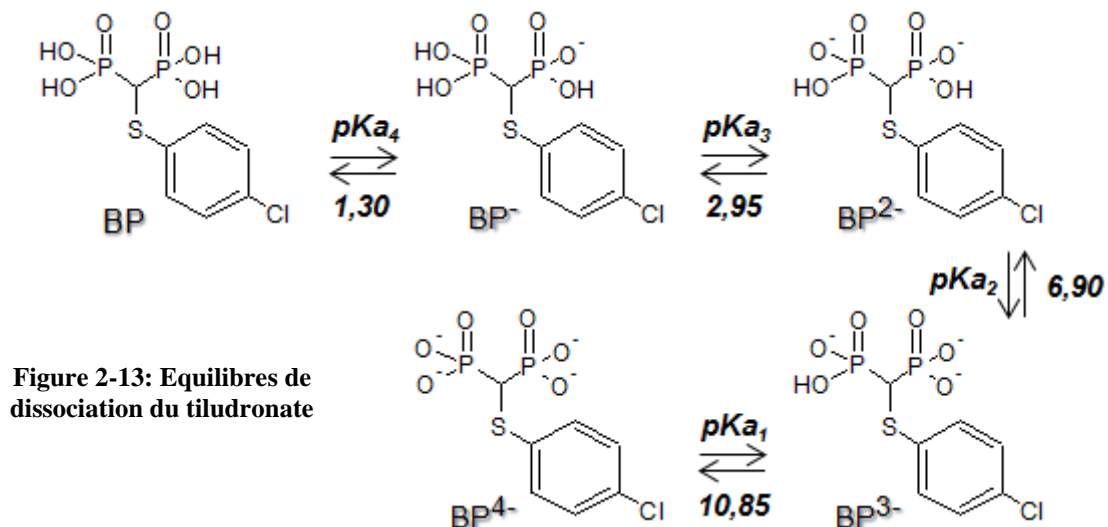


Figure 2-13: Equilibres de dissociation du tiludronate

I. 1. 1. b. FTIR

La figure 2-14 montre le spectre FTIR du tiludronate. Les bandes d'absorption les plus intenses observées sont principalement attribuées (tableau 2-10) aux vibrations de la chaîne R2 issues du cycle aromatique : $\nu\text{C}=\text{C}$ ($1600\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$), $\delta\text{C-H}_{\text{as}}$ aliphatique (1480 cm^{-1}), $\delta\text{C-H}_s$ aliphatique (1390 cm^{-1}), $\delta\text{C-H}$ en dehors du plan disubstitué ($820, 795\text{-}770\text{ cm}^{-1}$), disubstitution 1,4 ($1125\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$), phosphate aromatique ($1240\text{-}880\text{ cm}^{-1}$), $\nu\text{P-C}$ (660 cm^{-1}) et C-S (710 cm^{-1}) [Durig *et al.* 1987; Bonnery *et al.* 1994].

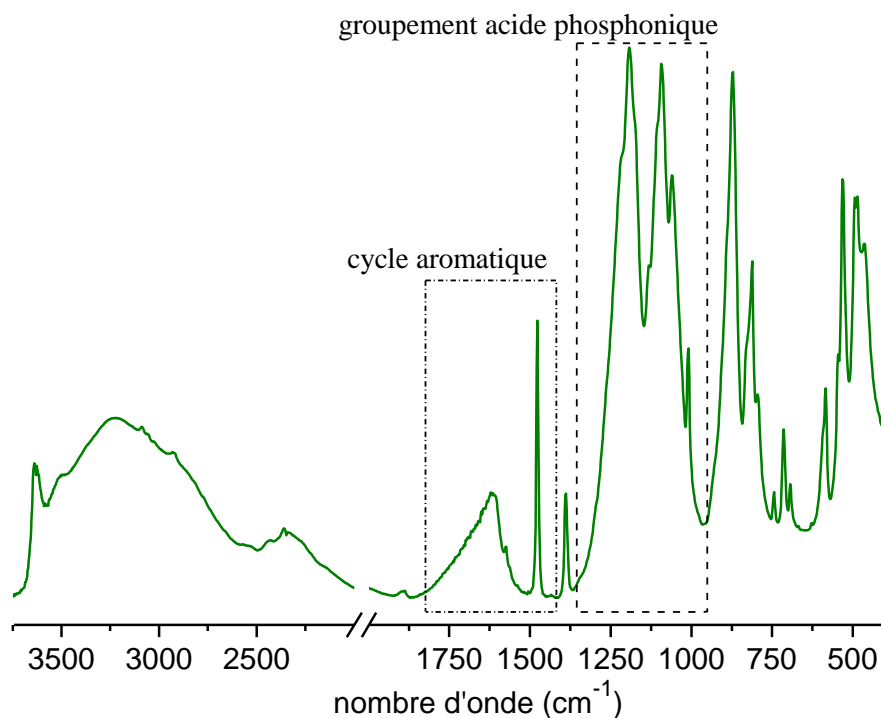


Figure 2-14: Spectre FTIR du tiludronate disodique hémihydraté

Attribution	IR (cm^{-1})
$\nu\text{C}=\text{C}$ aromatiques dans le plan	1600
	1580
	1500
	1480
$\delta\text{C-H}_{\text{as}}$ aliphatique	1450
$\delta\text{C-H}_s$ aliphatique	1390
$\delta\text{C-H}$ hors du plan disubstitution	820
	795-770
disubstitution 1,4	1125-1090
Phosphate aromatique : P-O	1240
	1190
	1090
	1050
	995-880
$\nu\text{P-C}$	660
C-S	710

Tableau 2-10: Attributions des bandes d'adsorption observées pour le tiludronate disodique [Durig *et al.* 1987; Bonnery *et al.* 1994]

I. 1. 1. c. RAMAN

Le spectre Raman du tiludronate est reporté en figure 2-15. Le tableau 2-11 répertorie les attributions des bandes Raman du tiludronate correspondant aux bandes d'absorption issues du cycle aromatique de la chaîne R2 avec $\nu\text{C}=\text{C}$ dans le plan ($1635\text{-}1474\text{ cm}^{-1}$), $\delta\text{C-H}$ dans le plan ($1295\text{-}1034\text{ cm}^{-1}$), $\nu\text{C}=\text{S}$ ($1097\text{-}1072\text{ cm}^{-1}$), $\nu\text{C-S}$ aliphatique ($630\text{-}790\text{ cm}^{-1}$), phosphate aromatique ($1050\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$), $\nu\text{P-C}$ (660 cm^{-1}), δCCC en dehors du plan (458 cm^{-1}) et $\nu\text{C-Cl}$ ($550\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) [Horiba Jobin Yvon ; Durig *et al.* 1987; Fleming *et al.* 2008].

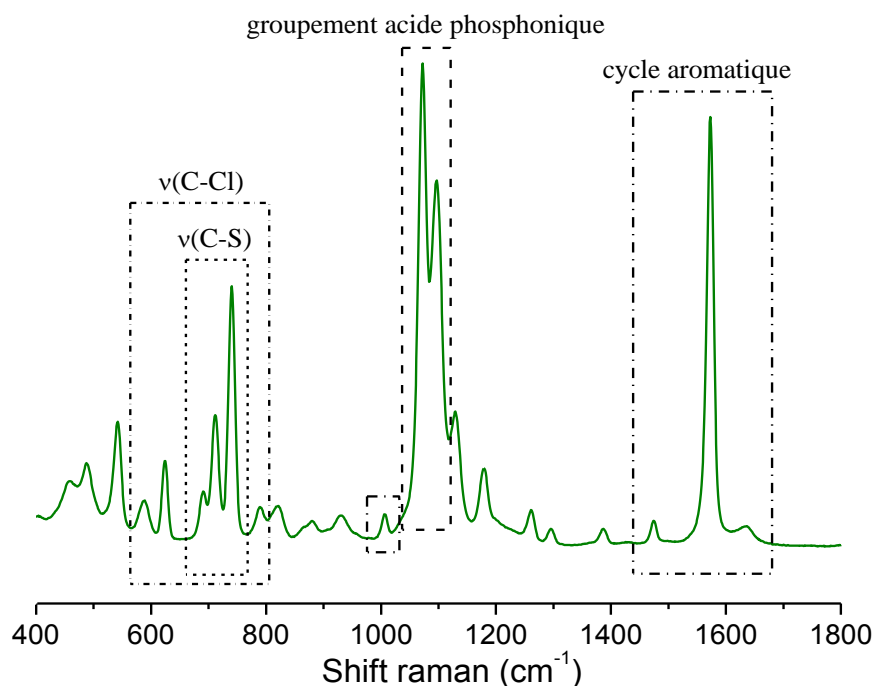


Figure 2-15: Spectre Raman du tiludronate disodique hémihydraté

Attribution	Raman (cm^{-1})
$\nu C=C$ dans le plan	1635
	1575
	1474
$\delta C-H$ dans le plan	1295
	1179
	1034
$\delta C-H$ hors du plan disubstitution	745
$\nu C=S$	1097
	1072
$\nu C-S$ aliphatique	630-790
Phosphate aromatique	1050-1090
P-C	660
δCCC hors du plan	458
$\nu C-Cl$	550-800

Tableau 2-11: Attributions des bandes d'adsorption observées pour le tiludronate disodique [Horiba Jobin Yvon ; Durig *et al.* 1987; Fleming *et al.* 2008]

I. 1. 1. d. RMN du solide

Une analyse par RMN du solide du phosphore sur le tiludronate disodique hémihydraté a été menée en ^{31}P et $^1H \rightarrow ^{31}P$ CP MAS avec un temps de contact (τ) de 3 ms afin de préciser l'environnement local des noyaux de phosphore. Les spectres du phosphore du tiludronate reportés en figure 2-16 présentent deux raies principales à 15,2 et 19,4 ppm indiquant deux environnements différents du ^{31}P dans la structure. Les deux groupements phosphonates ne sont donc pas chimiquement équivalents dans la molécule. Ironside *et al.* lors de son étude sur l'interaction bisphosphonates-minéral osseux a noté la présence de deux raies sur le spectre RMN du phosphore du tiludronate disodique en accord avec nos observations [Ironside *et al.* 2010]. On note que ces raies sont dissymétriques et présentent des épaulements.

Sur le spectre RMN du proton du tiludronate disodique hémihydraté, présenté en figure 2-16, on distingue : un pic à 13,5 ppm attribué aux ions OH^- impliqués dans des liaisons H fortes, dans notre cas probablement les hydroxyles des phosphonates; un pic large à 6 ppm et trois épaulements à 10 ppm ; à 3 ppm attribuable au proton issu de la chaîne R1 du BP et à 1,2 ppm.

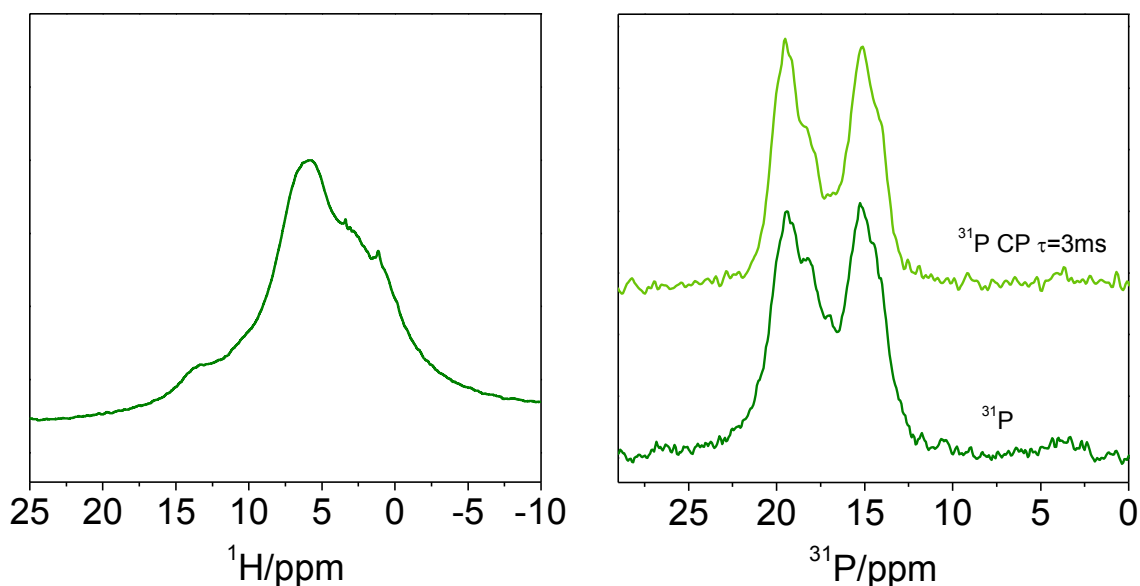


Figure 2-16: Spectre RMN du proton et du phosphore ^{31}P et $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS avec un temps de contact (τ) de 3ms du tiludronate disodique hémihydraté

I. 1. 2. Dosage du principe actif en solution

La méthode de dosage utilisée habituellement pour quantifier le bisphosphonate en solution est le dosage par spectrophotométrie UV [Errassifi 2011] puisque le tiludronate possède un cycle aromatique qui est un groupement chromophore. Des spectres UV-visible ont été effectués, pour une gamme spectrale : 200-800nm, sur un échantillonnage de solutions contenant différentes concentration en tiludronate (1 - 5,7mg/L) dans le milieu d'adsorption (KCl 10^{-3}M) afin de connaître la longueur d'onde de détection du tiludronate et l'influence de la teneur en principe actif sur celle-ci. Les résultats, exposés en Figure 2-17, définissent la longueur d'onde de travail à 265nm sur la gamme de concentration étudiée.

Aussi, une courbe d'étalonnage a été établie par spectrophotométrie UV à partir de solution de tiludronate couvrant une gamme de concentration de 0 à $80\mu\text{mol/L}$ afin de valider la loi de Beer-Lambert (figure 2-18).

Ainsi, le dosage du tiludronate en solution dans le milieu d'adsorption sera effectué à $\lambda=265\text{nm}$ pour tous les points de la cinétique et de l'isotherme d'adsorption.

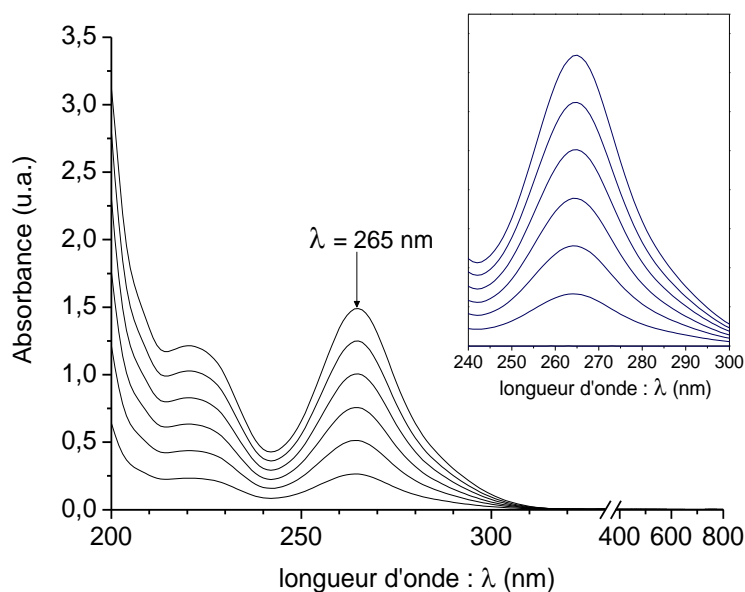


Figure 2-17 : Spectres UV-visible du tiludronate disodique hémihydraté à différentes concentrations (1-5,7mg/L) dans un milieu KCl (1mM) à pH et température physiologiques

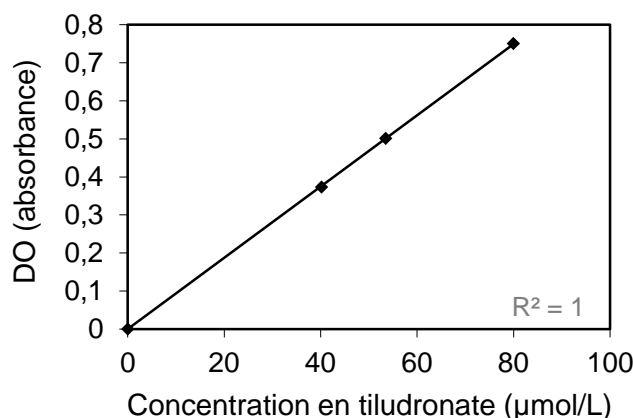


Figure 2-18: Courbe d'étalonnage du tiludronate par spectrophotométrie UV à $\lambda=265\text{nm}$

I. 2. Protocole d'adsorption

Les proportions adsorbat-adsorbant ont fait l'objet d'une étude antérieure montrant un rapport optimal solution-poudre : 50mg/5mL établi précédemment par Barroug *et al.* afin de limiter le phénomène de dissolution de l'apatite [Errassifi 2011]. Les poudres d'apatites nanocristallines mal cristallisées tamisées à 125 μm sont dispersées dans une solution aqueuse de tiludronate diluée dans un milieu KCl 10^{-3}M constituant le milieu d'adsorption (figure 2-19). Le mode opératoire détaillé est présenté en annexe. L'incubation des échantillons a lieu dans une étuve thermostatée programmée à la température physiologique 37°C. Une fois les échantillons centrifugés, les poudres sont lavées avec de l'eau désionisée et les surnageants filtrés et lyophilisés en vue des caractérisations ultérieures. Les expériences ont été répétées trois fois pour chaque point de l'isotherme.

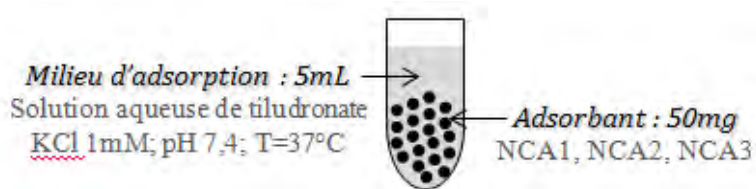


Figure 2-19: Schéma du protocole d'adsorption utilisé

Une étude a été menée pour vérifier qu'aucune désorption n'a lieu lors de l'étape de lavage des poudres suite à l'incubation. Ainsi, les eaux issues des opérations de lavage ont été caractérisées et les résultats confirment que les molécules de tiludronate adsorbées sur les apatites nanocristallines biomimétiques ne sont pas libérées en quantité suffisante pour être détectées lors de leur mise en solution aqueuse après adsorption ou par simple lavage, comme cela avait déjà été démontré par des études précédentes menées dans les mêmes conditions avec un autre bisphosphonate, le risédronate, par Errassifi et al. [Errassifi 2011]. De plus, les mêmes études ont confirmé que la nature du tube en polyéthylène utilisé ne fait l'objet d'aucune adsorption sur les parois.

1.3. Cinétique d'adsorption

Une étude de la cinétique d'adsorption du tiludronate sur une poudre synthétisée a été réalisée à pH et température physiologique, dans un milieu KCl 1mM, afin de pouvoir déterminer le temps d'incubation optimal au-delà duquel la quantité de tiludronate adsorbée reste maximale et constante. Les études précédentes [Errassifi 2011] ont montré que l'allure de la cinétique et la durée d'incubation ne dépendaient pas de la nature de l'apatite biomimétique synthétisée. Par conséquent, seule une des poudres, NCA1 en l'occurrence, a fait l'objet de l'étude avec une concentration en tiludronate de 2,7mM. Le protocole de la cinétique d'adsorption est présent en annexe et les résultats obtenus sont reportés figure 2-20.

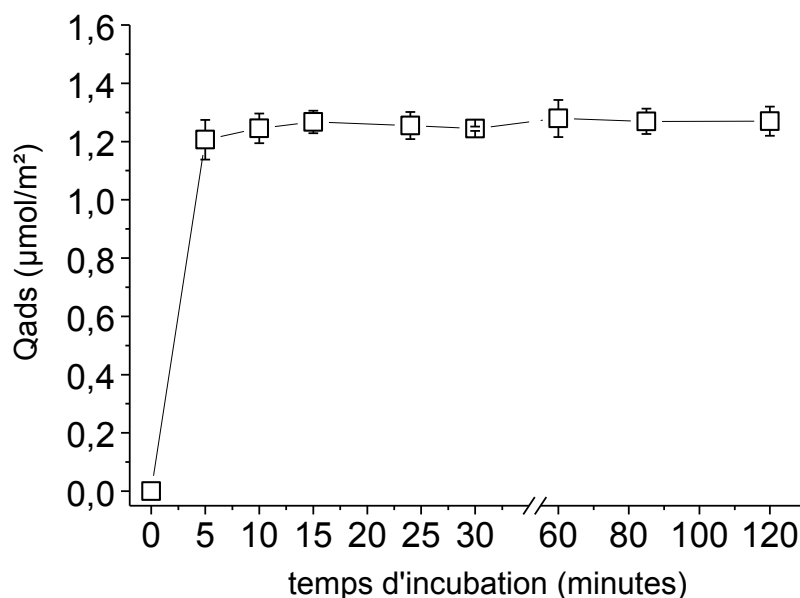


Figure 2-20 : Cinétique d'adsorption du tiludronate sur le support NCA1 dans un milieu KCl (1mM) à température et pH physiologiques

Cette étude cinétique permet de déterminer le temps d'incubation au-delà duquel la quantité de tiludronate adsorbée reste maximale. Au bout de 20min d'incubation, le palier d'adsorption est déjà atteint mais par précaution, le temps d'incubation a été établi à 2h.

1. 4. Isotherme d'adsorption

Une fois que l'adsorption dont le protocole est présenté en annexe est effectuée, des analyses seront réalisées sur les poudres et les surnageants par le biais de diverses techniques de caractérisation afin de déterminer les mécanismes mis en jeu lors de l'adsorption de molécules de tiludronate sur les différents modèles de minéral osseux synthétisés.

Dans un premier temps, afin de pouvoir déterminer la quantité de principe actif adsorbée sur les poudres synthétisées, le dosage du principe actif subsistant en solution après adsorption a été réalisé.

1. 4. 1. Choix du modèle d'adsorption

Les différentes isothermes d'adsorption présentées plus haut : Langmuir, Langmuir-Freundlich et Freundlich ont été testés sur les résultats obtenus avec l'apatite nanocristalline biomimétique NCA1 (figures 2-21 et 2-22).

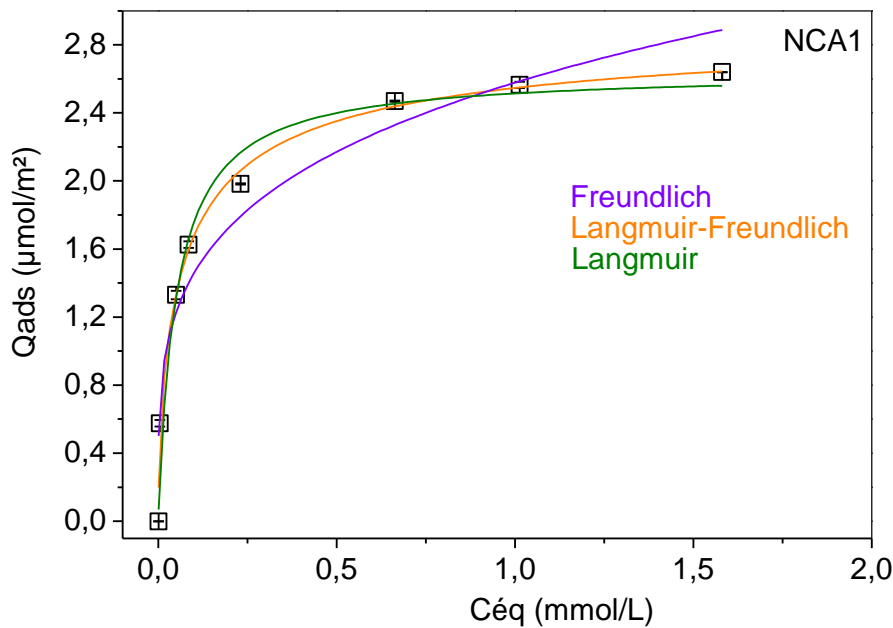


Figure 2-20 : Isotherme d'adsorption du composé NCA1 selon trois modèles différents d'adsorption: Langmuir, Langmuir-Freundlich et Freundlich.

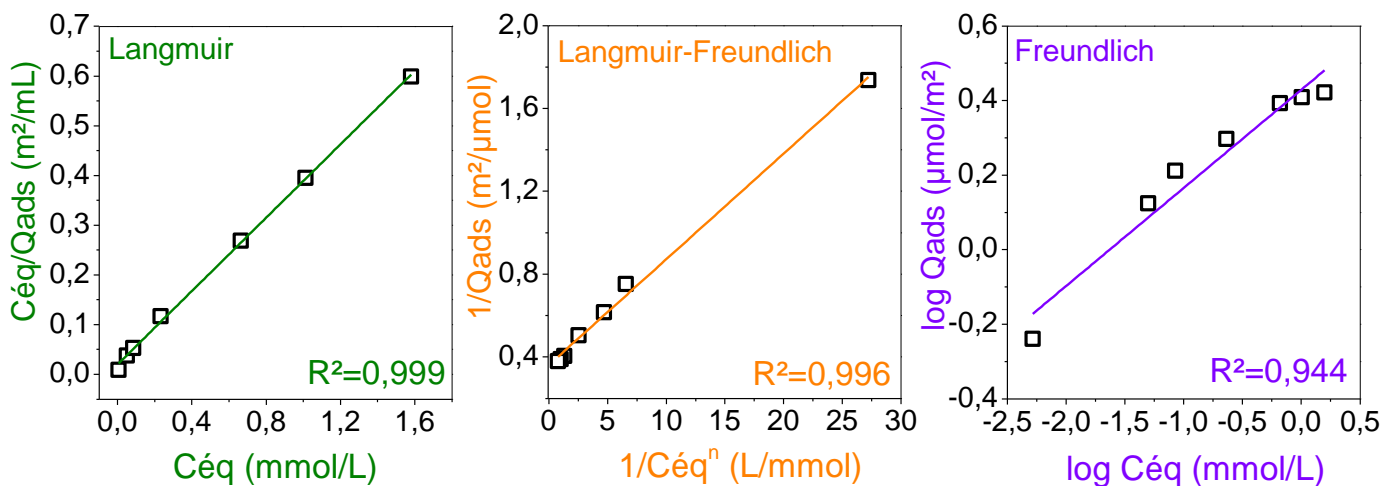


Figure 2-21 : Linéarisation des isothermes d'adsorption de NCA1 selon les trois modèles cités.

Le tracé des linéarisations des trois isothermes d'adsorption confortent les études préalablement menées [Barroug *et al.* 2004; Errassifi *et al.* 2010] démontrant la validité du modèle de Langmuir pour rendre compte de l'adsorption de BP sur des apatites biomimétiques nanocristallines.

1. 4. 2. Isotherme d'adsorption : isotherme de Langmuir

Ainsi, le modèle de Langmuir a été appliqué aux résultats obtenus avec les trois poudres d'apatites biomimétiques et sont représentés en figure 2-23. L'évolution de la quantité de tiludronate adsorbée à partir des solutions aqueuses initiales (0 - 6,7mM) en fonction de la concentration de tiludronate restante en solution a été tracée (figure 2-23).

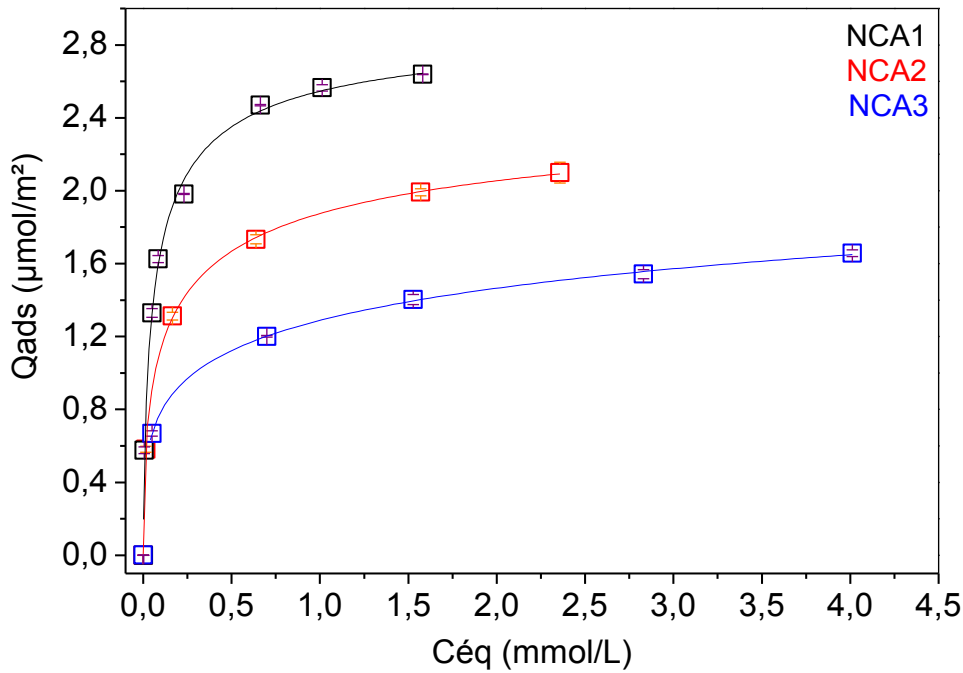


Figure 2-23: Isothermes de Langmuir des trois composés : NCA1, NCA2 et NCA3

La quantité de tiludronate adsorbée atteint un plateau pour des concentrations à l'équilibre relativement faibles (environ 1-1,5mM). Le pourcentage pondéral est alors relativement élevé soit respectivement 16%, 13%, 8% massique pour NCA1, NCA2 et NCA3, attestant ainsi de la forte affinité des molécules de tiludronate pour la surface des apatites biomimétiques nanocristallines.

Les paramètres d'adsorption : K (constante d'affinité des molécules de tiludronate pour la surface de NCA) et N (quantité adsorbée à saturation) sont déterminés à partir de la linéarisation des isothermes de Langmuir pour les trois composés (figures 2-24 et 2-25) selon l'équation (1) en traçant C_{eq}/Q_{ads} en fonction de C_{eq} .

$$\frac{C_{eq}}{Q_{ads}} = \frac{C_{eq}}{N} + \frac{1}{(K \times N)} \quad (2)$$

La surface occupée par une molécule : δ , correspondant à la quantité de molécules de tiludronate fixée à la saturation dans les conditions étudiées est, quant à elle, évaluée grâce à l'équation suivante :

$$\delta = \frac{S_{BET}}{N \times N_a} \quad (12)$$

Avec: - S_{BET} (m^2/g): surface spécifique de l'apatite considérée,
 - N (mol/g): quantité adsorbée à saturation soit le nombre maximum de site d'adsorption occupé par unité de surface,
 - N_a : nombre d'Avogadro= $6,022 \cdot 10^{23}$

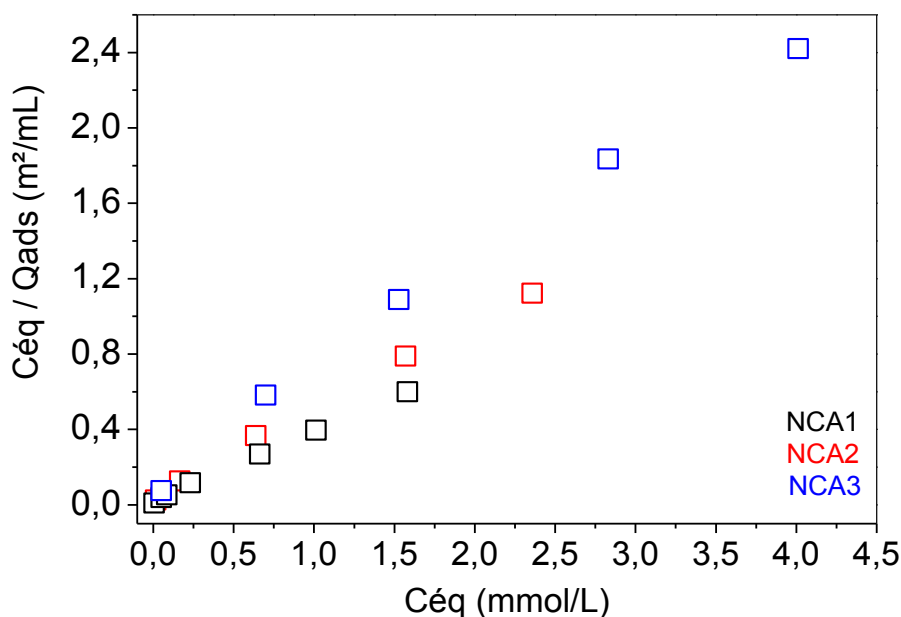


Figure 2-24: Linéarisation des isothermes de Langmuir des trois composés : NCA1, NCA2 et NCA3

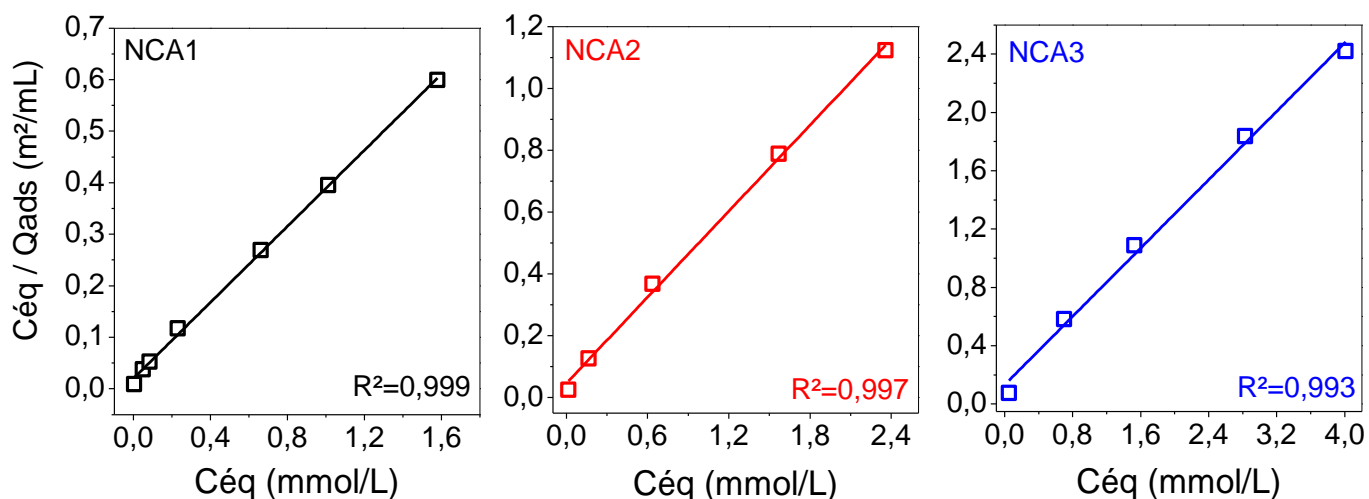


Figure 2-25: Linéarisation des isothermes de Langmuir pour chacun des trois composés : NCA1, NCA2 et NCA3

Les paramètres d'adsorption : K et N obtenus ainsi que la surface occupée par une molécule calculée : δ sont répertoriés dans le tableau 2-12.

Noms	Carbonatation Maturation	pente	N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	ordonnée à l'origine	K (L/mmol)	δ (nm^2)
NCA1	non carbonatée 0 jour	$0,369 \pm 0,006$	$2,710 \pm 0,006$	$0,020 \pm 0,004$	$18,48 \pm 0,86$	0,61
NCA2	carbonatée 31 jours	$0,46 \pm 0,02$	$2,17 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,02$	$10,13 \pm 1,27$	0,77
NCA3	non carbonatée 31 jours	$0,59 \pm 0,03$	$1,69 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,06$	$4,44 \pm 0,97$	0,98

Tableau 2-12: Tableau récapitulatif des paramètres d'adsorption : K et N et de la surface occupée par une molécule de tiludronate : δ pour les trois composés NCA1, NCA2 et NCA3

- Les valeurs des paramètres d'adsorption : N et K sont respectivement comprises entre 2,71 et 1,69 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ et entre 18,48 et 4,44 L/mmol. Ces valeurs sont proches de celles obtenues dans de précédentes études menées sur l'adsorption d'un autre bisphosphonate, le risédronate, sur les mêmes supports (NCA) dans des conditions similaires [Al-Kattan *et al.* 2010; Errassifi 2011].

Les résultats obtenus montrent une diminution des paramètres d'adsorption K et N avec la maturation ($K_{\text{NCA3}} < K_{\text{NCA1}}$ et $N_{\text{NCA3}} < N_{\text{NCA1}}$) et une augmentation de ceux-ci avec la carbonatation ($K_{\text{NCA2}} > K_{\text{NCA3}}$ et $N_{\text{NCA2}} > N_{\text{NCA3}}$).

Les différences observées entre les paramètres d'adsorption des différentes apatites biomimétiques (tableau 2-12) attestent de l'importance de la nature et des caractéristiques de surface des NCA sur la quantité de tiludronate adsorbée [Ouzat *et al.* 1999]. En effet, la capacité d'adsorption est intrinsèquement liée à la présence de la couche labile en surface des NCA, à son état mais aussi aux ions qui composent cette couche et la couche apatitique.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus sur les échanges ioniques, qui montrent que la disparition de la couche hydratée et la croissance cristalline [Eichert *et al.* 2008], amoindrit la capacité d'échanges avec la solution [Cazalbou *et al.* 2004]. Cette tendance a aussi été remarquée lors de précédentes études d'adsorption de risédronate sur des apatites nanocristallines biomimétiques [Errassifi 2011].

La présence de carbonates (apatitiques et/ou labiles) se traduit par une augmentation de K et N . En effet, les carbonates ayant un rôle d'inhibiteur de croissance cristalline, ils préservent la couche hydratée si on compare avec l'apatite maturée non carbonatée. Par conséquent, les poudres synthétisées suivent le classement : $\text{NCA1} > \text{NCA2} > \text{NCA3}$ en terme de capacité d'adsorption par unité de surface.

- Les valeurs de surface occupée par une molécule de tiludronate : δ sont comprises entre 0,61 et 0,98 nm^2 . La surface apparente occupée par une molécule à saturation augmente avec la maturation et diminue avec la carbonatation à l'inverse du nombre maximum de site d'adsorption occupé par unité de surface (N). Ce paramètre a précédemment été étudié lors de l'adsorption de risédronate sur des apatites NCA par Errassifi *et al.* et présente le même ordre de grandeur [Errassifi 2011].

I. 5. Caractérisation après adsorption

I. 5. 1. Dosage en solution des ions libérés

Lors de la mise en contact de la solution avec nos poudres apatitiques biomimétiques pendant l'adsorption, un phénomène de dissolution va avoir lieu, et des ions calcium et phosphate vont être libérés en solution. Le dosage de ces ions fera l'objet de ce paragraphe.

I. 5. 1. a. Dosage en solution des ions phosphate

Les ions phosphate sont dosés par spectrophotométrie UV (annexe) d'un complexe phosphovanadomolybdique [Bartlett 1959]. Afin de vérifier la méthode dans les conditions « réelles » de dosage, soit en présence du principe actif non adsorbé (effet matrice), différents volumes de principes actifs (1mL et 10mL) ont été ajoutés aux étalons de phosphate standards et analysés (figure 2-26).

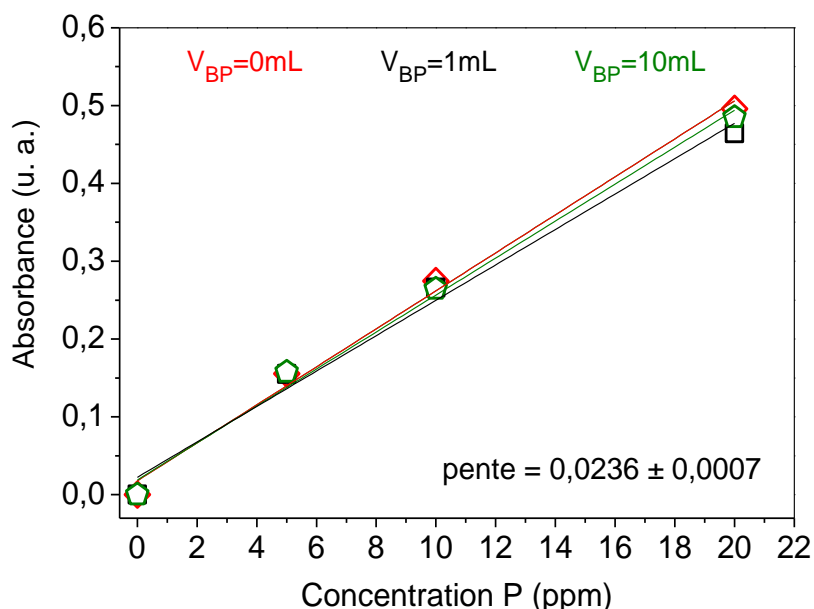


Figure 2-26: Vérification de la méthode de dosage par spectrométrie UV des ions phosphate en présence de tiludronate à différentes teneurs

La figure 2-26 atteste que la présence du principe actif dans les solutions étalons n'influe pas le dosage des ions phosphate. Ainsi cette étude validée, sera celle utilisée pour doser les ions phosphate en tous points des isothermes d'adsorption. L'évolution des teneurs en ions phosphate présents en solution, donc issus des poudres NCA1, NCA2, et NCA3, en fonction de la quantité de principe actif adsorbée sur ces mêmes poudres est présentée en figure 2-27.

I. 5. 1. b. Dosage en solution des ions calcium

La méthode utilisée pour doser de façon quantitative les ions calcium présents en solution, pour chaque point des isothermes, est la spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES) (voir annexe).

Dans un souci de comparaison, l'évolution des ions calcium en solution en fonction de la quantité de principe actif adsorbée a été ajoutée à celle des ions phosphate (figure 2-27).

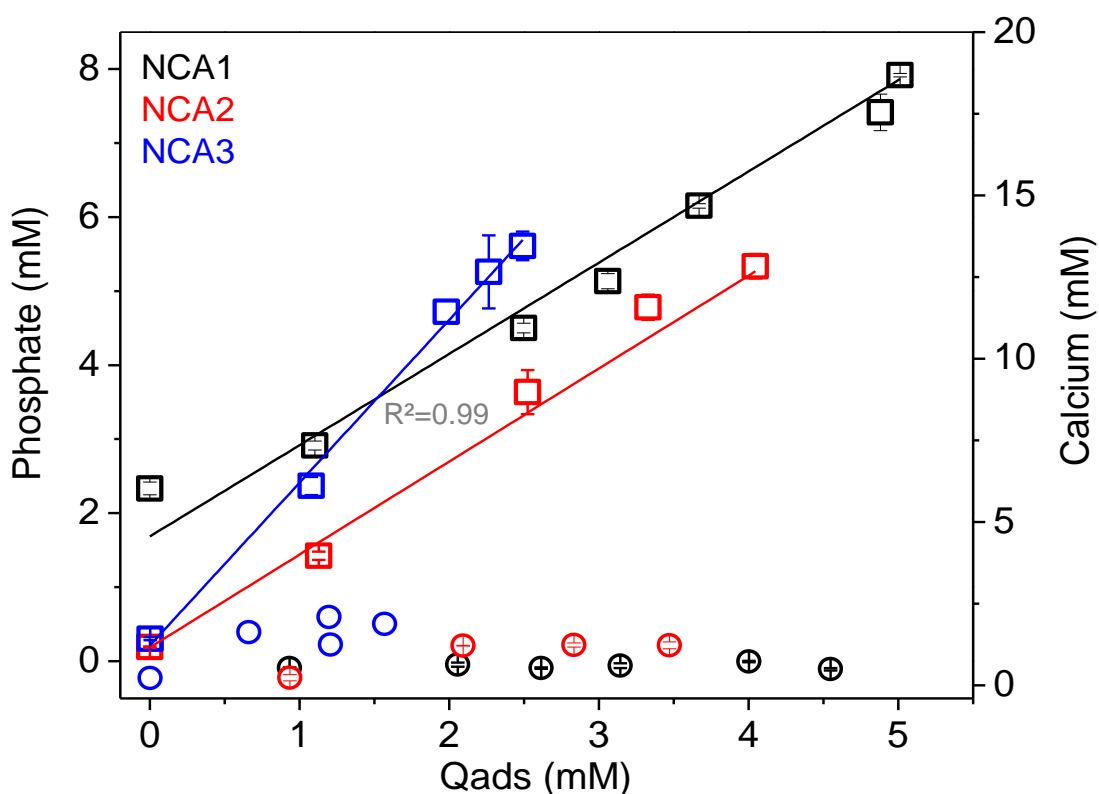


Figure 2-27 : Evolution des teneurs en ions phosphate (□) et calcium (○) libérés en fonction de la quantité de tiludronate adsorbée pour les trois composés synthétisés : NCA1, NCA2 et NCA3

La figure 2-27 met en évidence l'évolution linéaire et croissante des ions phosphates avec l'adsorption du principe actif et la stagnation des ions calcium dans ce même contexte d'adsorption.

En effet, la concentration des *ions calcium* en solution est faible et quasi-constante avec une légère augmentation quelle que soit la quantité de tiludronate adsorbée et n'est donc pas liée à Qads dans la réaction d'adsorption ; ce calcium provient uniquement de la dissolution du phosphate de calcium apatitique lors de la mise en solution aqueuse.

Les *ions phosphate* présents en solution lors de l'adsorption sont, quant à eux, issus de la dissolution du phosphate de calcium mais ils sont aussi liés à la quantité de tiludronate adsorbé.

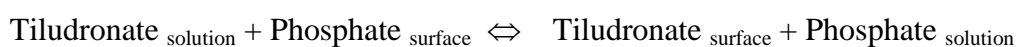
- Les phosphate issus la dissolution du phosphate de calcium apatitique lors de la mise en solution aqueuse peuvent quant à eux être quantifiés grâce à la mesure du point « zéro » (pulvérulents mis en contact avec le milieu KCl 10^{-3} M exempt de principe actif). Le phosphate libéré en solution issu de la dissolution est donc de $2,47 \pm 0,18$ ppm pour NCA1, de $0,25 \pm 0,06$ ppm pour NCA2 et de $0,30 \pm 0,03$ ppm pour NCA3. Ce résultat confirme l'influence de la maturation des nanocristaux sur la solubilité de ces apatites [Errassifi *et al.* 2010]. Ils confirment par ailleurs que la majeure partie des ions phosphate en solution est libérée par le phénomène d'adsorption.

Les rapports Ca/P en solution pour les « points zéro » sont respectivement de 0,63 ; 1,53 et 0,68 pour les composés NCA1, NCA2 et NCA3. Sachant que leurs rapports Ca/P des poudres sont différents, l'équilibre de dissolution apparaît donc comme non congruent. Ce phénomène, peut être associé à des réactions de surface autres que l'adsorption de tiludronate et sera discuté par la suite dans le chapitre 3.

- Une corrélation existe entre les ions phosphate libérés en solution et le tiludronate adsorbé en surface des NCA. L'adsorption du tiludronate est proportionnelle à la quantité de phosphate libérée en solution selon un rapport de $1,23 \pm 0,01$ pour NCA1, de $1,26 \pm 0,03$ pour NCA2 et de $2,20 \pm 0,08$ pour NCA3 (figure 2-27).

Cette corrélation a déjà été observée par Josse *et al.* [Josse *et al.* 2005] à l'occasion de l'adsorption de molécule de zolédronate en surface d'apatite déficiente en calcium (CDA). Une réaction de chimisorption mettant en jeu un échange PO_3-PO_4 a ainsi été spécifiée dans ce premier article. Par la suite certains auteurs tels que : Errassifi *et al.* [Errassifi *et al.* 2009] et Roussière *et al.* [Roussière *et al.* 2005] ont observé le même comportement lors de l'adsorption respectivement de molécules de risédronate sur des poudres apatitiques biomimétiques et de l'hydroxyapatite stœchiométrique et lors d'une association zolédronate – apatite déficiente en calcium (CDA).

Ainsi, l'adsorption du tiludronate sur les NCA semble être apparentée au même processus de chimisorption correspondant à un échange ionique entre les PO_3 issus des phosphonates en solution et les espèces phosphate issues de la surface des apatites biomimétiques dont la réaction d'échange peut être décrite sous la forme suivante (dans le cas d'un rapport 1/1) :



et illustrée comme suit en figure 2-28 :

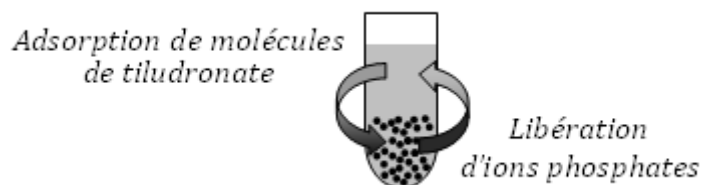


Figure 2-28: Schéma de l'échange ionique intervenant lors de la chimisorption

De plus, afin de vérifier que *le sodium* issu du tiludronate disodique ne rentre pas en jeu lors de l'adsorption, des analyses quantitatives par ICP-AES sur une dizaine de points de l'isotherme ont aussi été menées sur cet élément chimique. Les résultats obtenus montrent que la teneur en sodium en solution ne diminue pas en fonction de la quantité de tiludronate adsorbée et qu'elle concorde avec la concentration de tiludronate présente en solution au temps zéro. Par conséquent, le sodium n'est pas mis en jeu lors de l'échange ionique pendant l'adsorption.

Cette réaction d'adsorption est donc responsable en partie de la libération d'ions phosphates. Si on tient compte des équilibres de dissolution des apatites, l'augmentation de phosphate en solution devrait être accompagnée de la diminution de calcium. Pourtant, les résultats montrent une légère augmentation du calcium en solution en fonction de la quantité de tiludronate adsorbée. Cette évolution a déjà été notée lors de l'adsorption d'un autre bisphosphonate, le risédronate et a été interprétée par une probable formation de paires d'ions ou de complexes solubles entre le calcium en solution et les molécules de tiludronate [Errassifi *et al.* 2010].

1. 5. 2. Caractérisation du support apatitique après adsorption

La caractérisation après adsorption des supports apatitiques NCA1, NCA2 et NCA3 fera l'objet de cette partie. Les supports après adsorption sont notés : NCA_x+BP avec (x=1, 2 ou 3) et correspondent à l'adsorption au niveau du palier de l'isotherme soit Q_{ads} = 2,47 mM, 1,99 mM et 1,54 mM respectivement pour NCA1, NCA2 et NCA3.

1. 5. 2. a. Dosage des ions carbonates

Ainsi, le rôle des ions phosphate dans l'échange anionique mis en jeu avec les phosphonates lors de l'adsorption est bien connu. Cependant, le rôle des ions carbonates dans cet échange lors de la mise en contact avec des apatites carbonatées reste toujours mal connu et peu étudié. Aussi, les ions carbonates ont été dosés afin de vérifier leur implication ou non dans cet

échange. Pour cela, la méthode de dosage par coulométrie (voir annexe) a été employée sur la poudre contenant des carbonates NCA2 après adsorption d'une quantité de tiludronate correspondant au palier de l'isotherme.

Une diminution de la teneur en carbonates après adsorption par rapport à la poudre initiale est observée (perte significative et reproductible de $1,76 \pm 0,06$ %m CO_3) ainsi la mise en contact de l'apatite avec une solution enrichie en bisphosphonate s'accompagne d'une diminution de CO_3 . Cette tendance a déjà été observée dans de précédents travaux [Hina 1996] lors de l'immersion d'apatite biomimétique nanocristalline dans une solution enrichie en phosphate. En effet, la présence de la couche labile en surface des NCA va leur conférer une capacité d'échange et de substitution entre les ions labiles et les ions contenus dans la solution aqueuse [Rey *et al.* 2007].

Cependant, afin de définir l'impact de l'immersion des NCA dans une solution aqueuse exempt de principe actif, les pulvérulents ayant été mis en contact 2h à 37°C avec le milieu $\text{KCl } 10^{-3}\text{M}$ sans BP ont été analysés et sont nommés « point zéro ». Cette étude montre que la perte de CO_3 est identique à celle précédemment examinée. Aussi, la perte de CO_3 n'est pas due à l'adsorption mais surtout à la dissolution de l'apatite en milieu aqueux. L'origine de ce phénomène peut être attribuée à une dissolution des ions carbonates du solide accompagnée d'un dégagement de CO_2 au pH proche de la neutralité ou légèrement acide de la solution.

1. 5. 2. b. Diffraction des Rayons X

L'acquisition des diagrammes de diffraction des rayons X sur les poudres adsorbées permet de vérifier l'absence de phase cristalline supplémentaire. Les diffractogrammes des 3 composés ayant adsorbés du tiludronate soit NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP sont présents en figure 2-29.

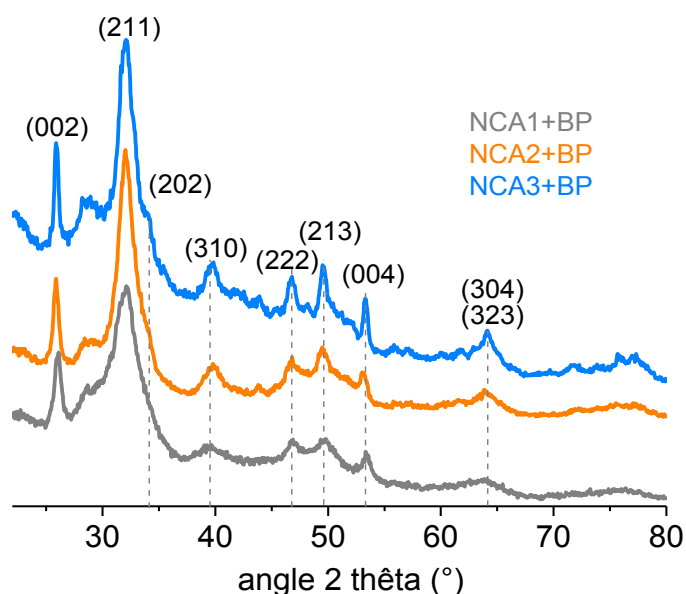


Figure 2-29:
Diagrammes de diffraction des RX des trois poudres après adsorption du tiludronate: NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP

Les diffractogrammes semblent ne pas présenter de phases supplémentaires en présence du tiludronate adsorbé. Afin de vérifier le seuil de détection du bisphosphonate par cette méthode d'analyse, un mélange solide-solide de poudre NCA1 avec une quantité de tiludronate correspondant au palier de l'isotherme soit 13%massique a été réalisé.

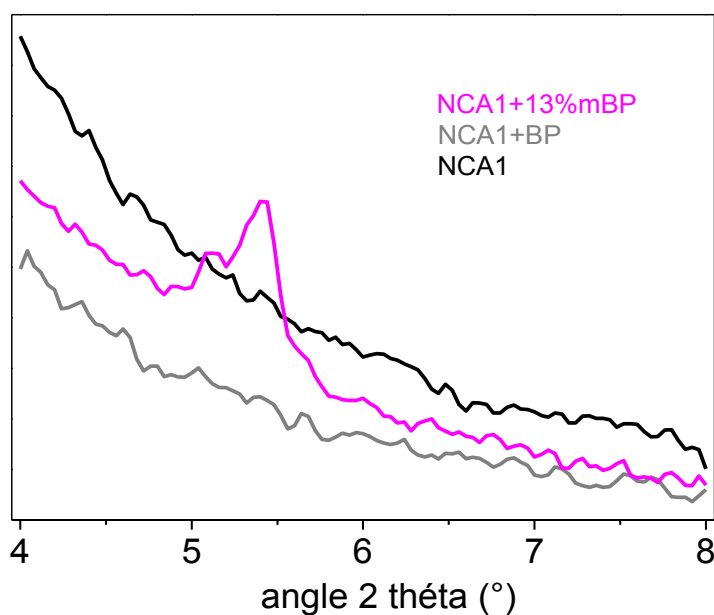


Figure 2-30: Diffractogrammes des trois composés : NCA1, NCA1+BPs et NCA1+13% mBPs sur une plage angulaire de 4-8°

Angle 2 θ (°)	I rel.
5,408	100
10,841	8,2
12,011	4,4
13,306	13,1
16,877	6,4
17,910	7,7
20,110	8,9
21,806	10,4
24,144	6,6
27,242	6,5
28,760	6,0
30,067	7,4
30,230	7,0
32,837	6,0
34,928	4,4

Tableau 2-13: Données cristallographiques de la diffraction des rayons X du tiludronate disodique [Bonnery *et al.* 1994]

Le diffractogramme de ce mélange appelé « NCA1-13% mBP » présente un pic à 5,408° (figure 2-30), caractéristique du pic le plus intense du tiludronate (tableau 2-13) [Bonnery *et*

al. 1994], contrairement au composé « NCA1+BP ». Ainsi, l'association du tiludronate avec les composés apatitiques biomimétiques ne peut pas être considérée comme un artefact de manipulation et correspond bien à une réaction d'adsorption par échange ionique. Le principe actif en solution n'est pas retrouvé dans le solide, sous une forme cristallisée en tout cas.

1. 5. 2. c. Observations par microscopie électronique à balayage et analyse EDS

Les microanalyses élémentaires réalisées sur les poudres après adsorption à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) muni d'un détecteur EDS (*Energy Dispersive Spectrometry*) fournissent des informations précises et qualificatives des éléments présents sur les poudres observées (annexe). Cette technique complémentaire permet de vérifier que les éléments constitutifs du tiludronate sont bien présents en surface de nos poudres. Notre attention portera sur les éléments soufre : S et chlore : Cl puisqu'ils sont seulement issus du principe actif contrairement aux autres éléments Ca, P, O, C et Ag. En effet, l'élément calcium : Ca est seulement issu du phosphate de calcium apatitique ; les éléments phosphore : P, oxygène : O et carbone : C proviennent à la fois du principe actif et du support et la présence de l'élément argent : Ag est dû à la métallisation de l'échantillon. La figure 2-32 présente les microanalyses élémentaires obtenues sur les poudres après adsorption. Dans un souci de comparaison, les microanalyses élémentaires effectuées sur les poudres avant adsorption sont aussi exposées sur cette même figure 2-32. De plus, les analyses ont été répétées sur plusieurs endroits de la poudre, dont les photos MEB sont reportées en figure 2-31, afin de confirmer l'homogénéité du composé.

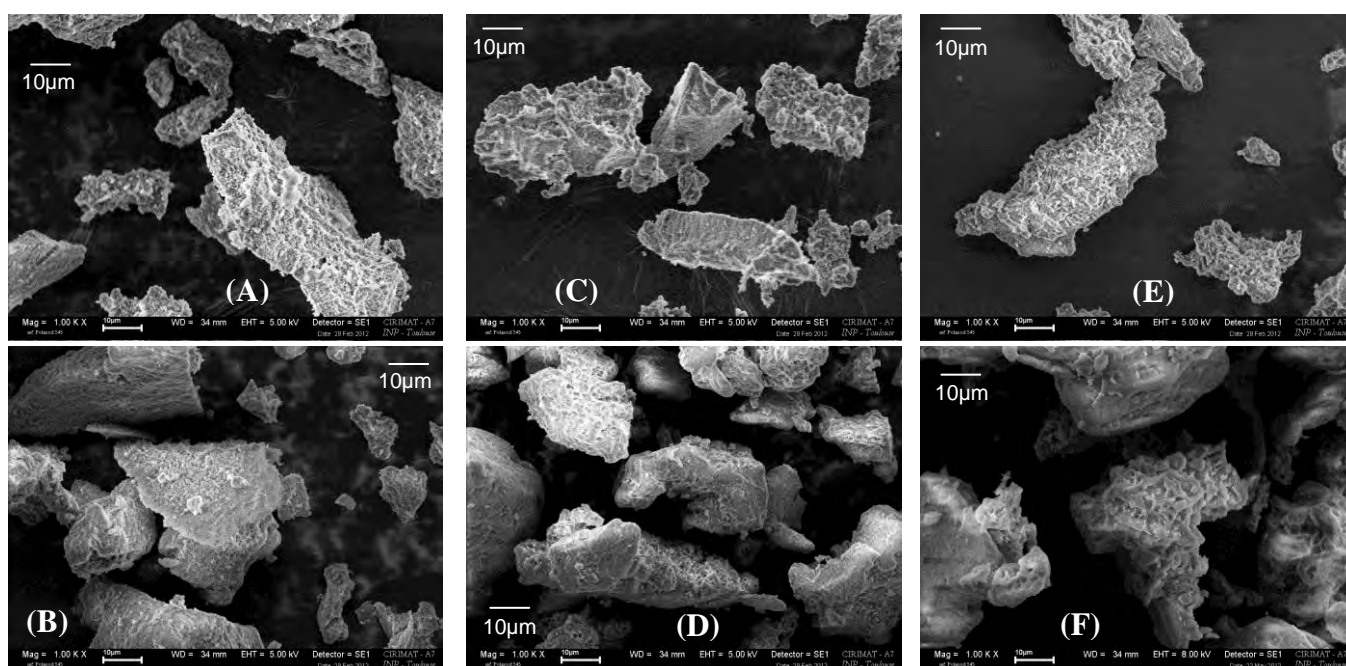


Figure 2-31: Observations par MEB des apatites NCA1 (A), NCA1+BP (B), NCA2 (C), NCA2+BP (D) NCA3 (E) et NCA3+BP (F).

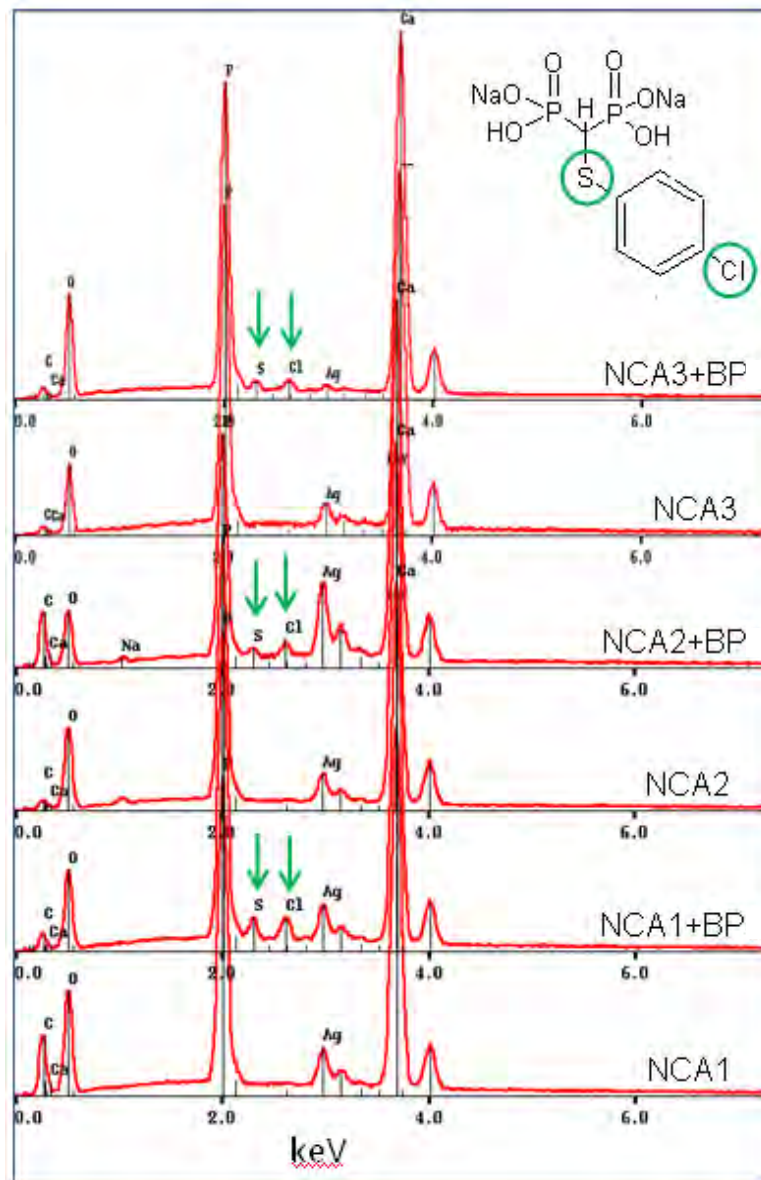


Figure 2-32: Microanalyses élémentaires des poudres NCA1, NCA2 et NCA3 avant et après adsorption

La présence des éléments soufre et chlore répartie de manière homogène sur les poudres après adsorption confirme l'association du tiludronate avec nos apatites.

1. 5. 2. d. Observations par MET

La figure 2-33 présente les micrographies obtenues pour les trois poudres après adsorption : NCA1+BPs, NCA2+BPs et NCA3+BPs à l'aide d'un microscope électronique en transmission (MET). La forme « de plaquettes » des particules est conservée même après adsorption, ainsi l'adsorption de tiludronate n'influence pas la morphologie des particules. Cependant, la longueur des particules diffère après adsorption au profit d'un accroissement de 2/3 de sa taille initiale (B.II.3.2). Concernant la largeur et l'épaisseur des particules, aucune tendance n'a pu être mise en évidence de façon précise. Une augmentation de la taille des cristaux des os de rats ostéoporotiques traités au tiludronate non accompagnée de

modifications structurales des cristaux a été constatée par Rohanzadeh *et al.* mettant ainsi en évidence l'effet promoteur du tiludronate [Rohanzadeh *et al.* 2000].

Notons que, lors de l'expérience, les poudres se dispersent mieux lorsqu'elles ont préalablement subi une adsorption du tiludronate à comparaison avec les poudres sans BPs (B.II.3.2).

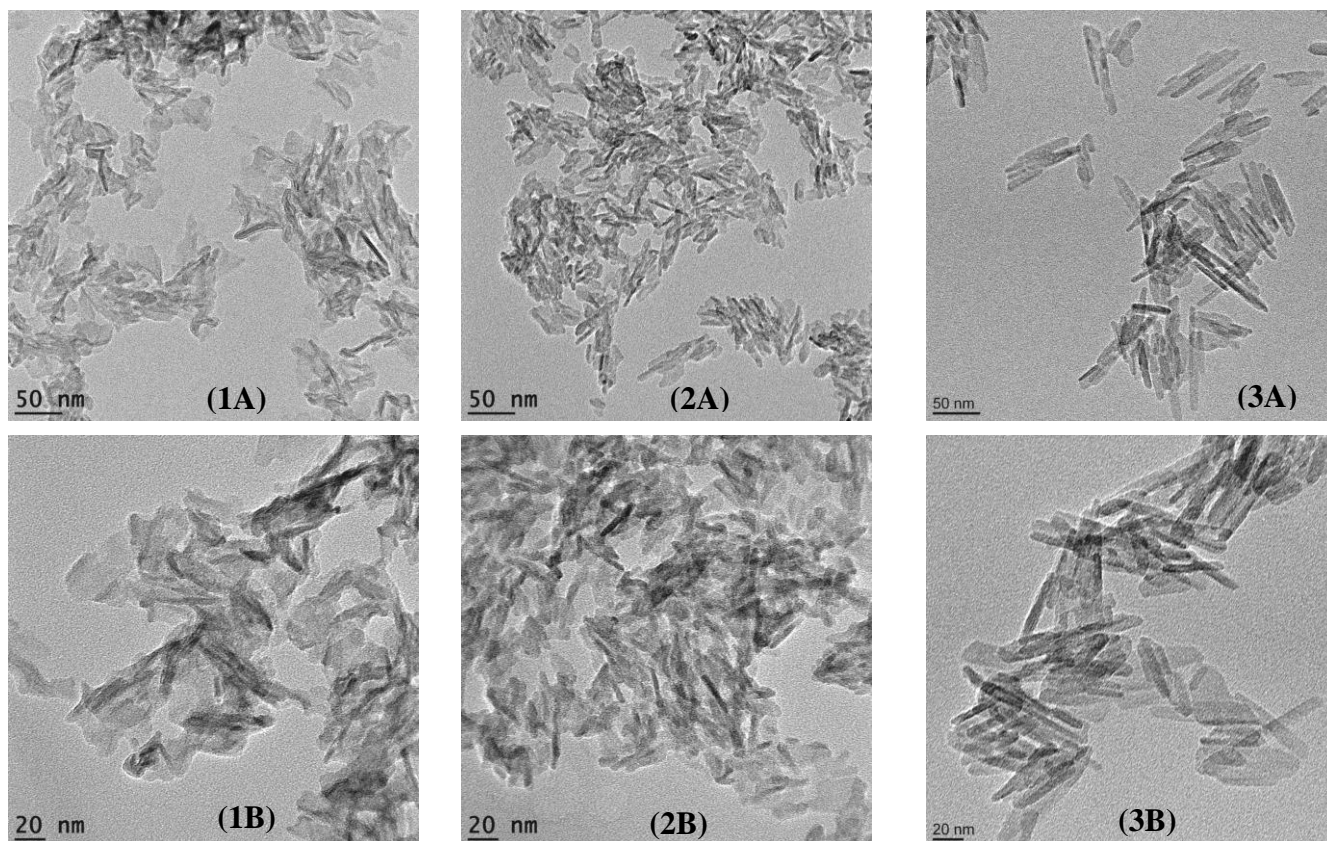


Figure 2-33: Micrographies des apatites NCA1+BP (1A-1B), NCA2+BP (2A-2B) et NCA3+BP (3A-3B).

1.5.2.e. FTIR

Les spectres infrarouges des phosphates de calcium apatitiques obtenus avant et après adsorption du tiludronate sont exposés sur les figures 2-34.

Les spectres d'absorbance FTIR des poudres après adsorption (figures 2-34 et 2-35) présentent des bandes d'absorption supplémentaires dont les seules visibles sont positionnées à 1480, 1390, 820, 715, 690 et 490 cm^{-1} . Bien que ces bandes soient toutes respectivement comprises dans les régions des bandes $\nu_3\text{CO}_3$, $\nu_1\text{PO}_4$, $\nu_4\text{PO}_4$ et $\nu_2\text{PO}_4$ et potentiellement superposées à celles-ci, le traitement mathématique de décomposition à l'aide du logiciel *Grams/386, Galactica*, a été réalisé sur les spectres des poudres après adsorption. Des difficultés ont été rencontrées lors de l'application du traitement mathématique à la bande $\nu_4\text{PO}_4$ en raison d'épaulements supplémentaires attribués au tiludronate difficiles à prendre en compte.

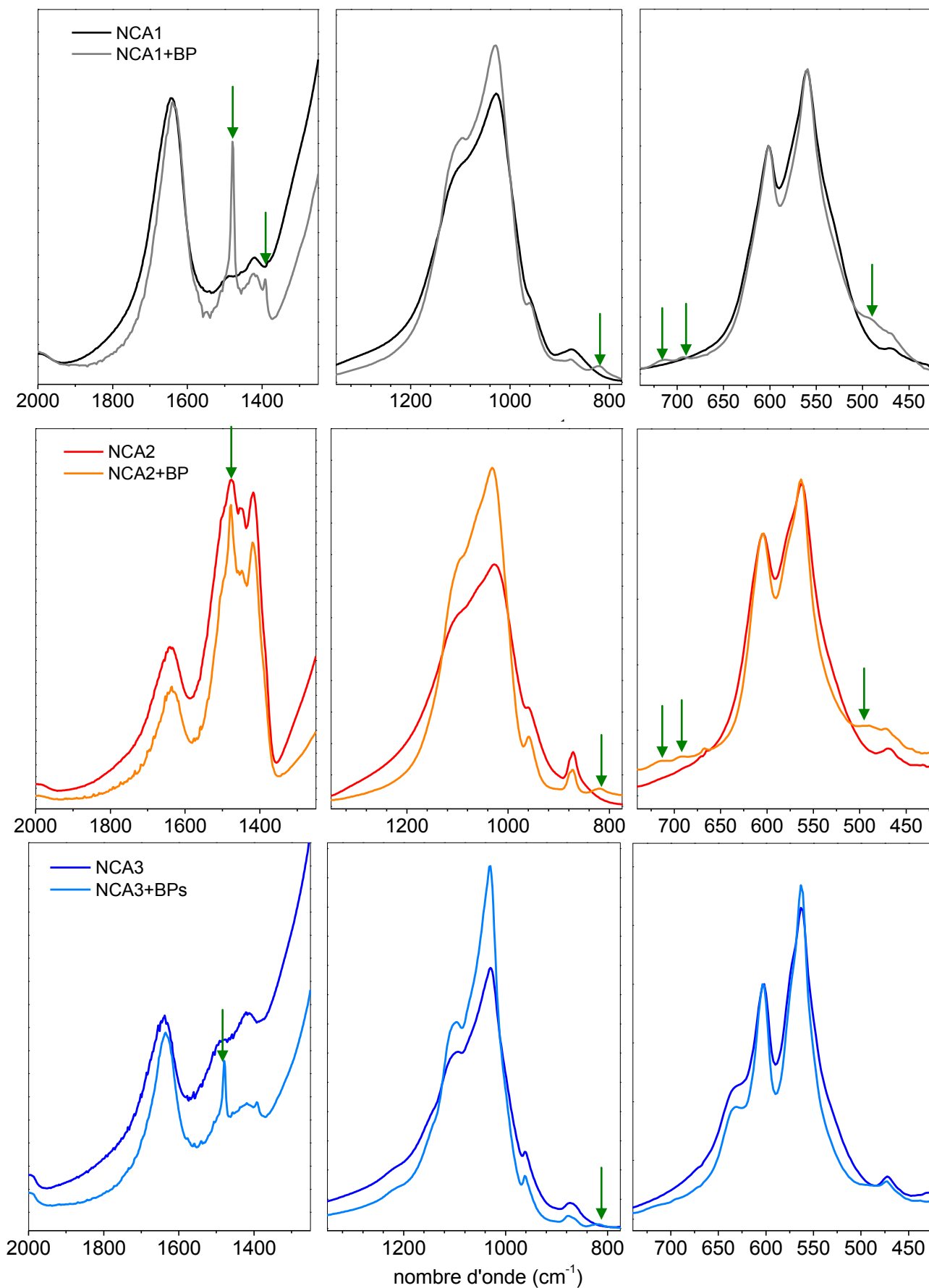


Figure 2-34: Spectres FTIR des trois apatites nanocristallines biomimétiques synthétisées avant (NCA1, NCA2, NCA3) et après adsorption du tiludronate (NCA1+BP, NCA2+BP, NCA3+BP) focalisés sur les régions spectrales : 2000-1250 cm^{-1} , 1345-775 cm^{-1} , 740-425 cm^{-1}
Les flèches indiquent la probable contribution du tiludronate

Dans le traitement mathématique utilisé, la contribution des bandes à 715, 690 et 490 cm^{-1} liées au tiludronate a été considérée et semble nécessaire à une meilleure décomposition (Figure 2-14 (2)). Cependant, la présence de ces trois bandes supplémentaires influence les bandes environnantes bien que les bandes PO_4^{3-} apatitiques semblent moins affectées (figure 2-35). Par conséquent, le traitement mathématique de décomposition ne peut être fait avec certitude.

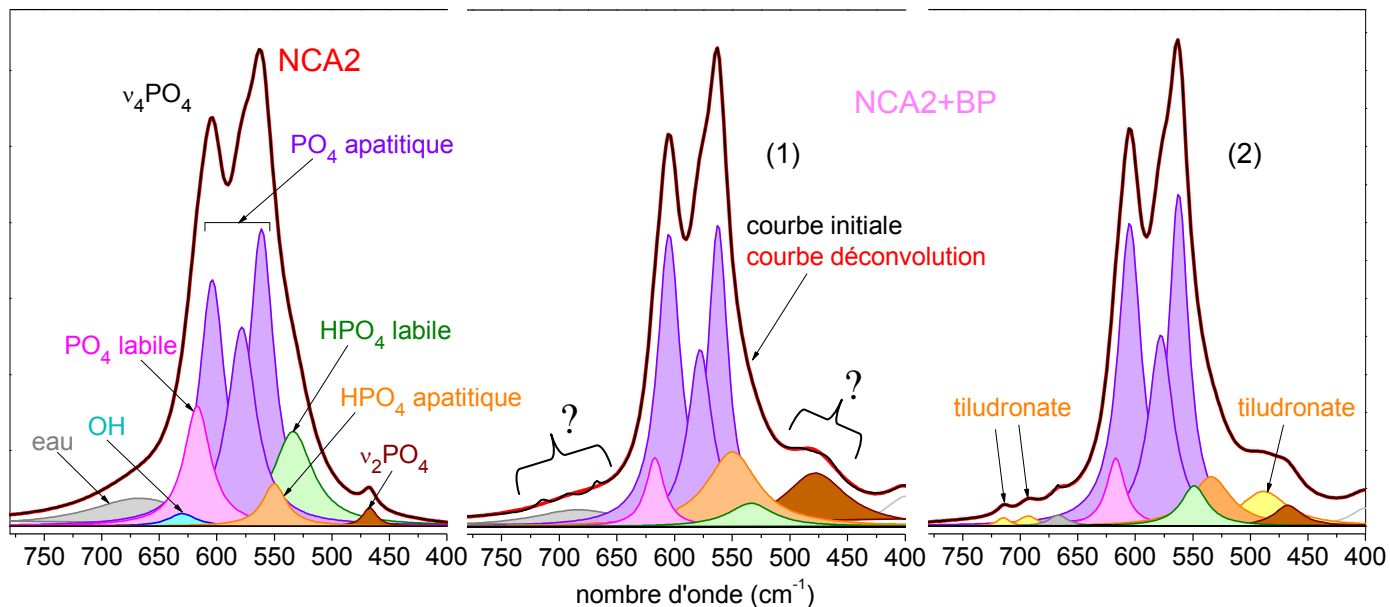


Figure 2-35: Décompositions des bandes d'absorption ν_4 et ν_2 des groupements phosphate. Exemple de décompositions de NCA2 avant (NCA2) et après adsorption (NCA2+BP) selon différentes contributions des bandes probablement attribuées au tiludronate (2 et 3)

Néanmoins, quel que soit le traitement mathématique employé (avec ou sans la contribution des trois bandes), l'adsorption du tiludronate impacte considérablement les ions labiles (HPO_4^{2-} et PO_4^{3-}) (figure 2-35). Aussi, afin de pouvoir différencier l'influence de la mise en solution aqueuse des poudres de l'influence de l'adsorption de façon semi-quantitative, l'évolution des bandes d'absorption ν_4 et ν_2 des groupements phosphate a été étudiée sur les poudres avant adsorption, sur les « points zéro » et sur les poudres après adsorption à l'aide des deux traitements mathématiques (sans et avec contribution des trois bandes) (figure 2-35 (1 et 2)). La figure 2-36 récapitule ces évolutions. D'après le tracé des évolutions, on remarque la diminution des ions HPO_4 labiles, dans les cas de NCA1 et NCA2, qui semble à la fois en partie due à la mise en suspension des apatites et à l'adsorption du tiludronate. La diminution des ions PO_4 labiles apparaît, quant à elle, de façon moins significative et issue principalement de la mise en suspension tout comme les ions OH^- . Notons que ces observations sont plus remarquables dans le cas de NCA1 et NCA2 que NCA3. Toutefois, des réserves sont à émettre sur ces résultats qui ne restent que des tendances.

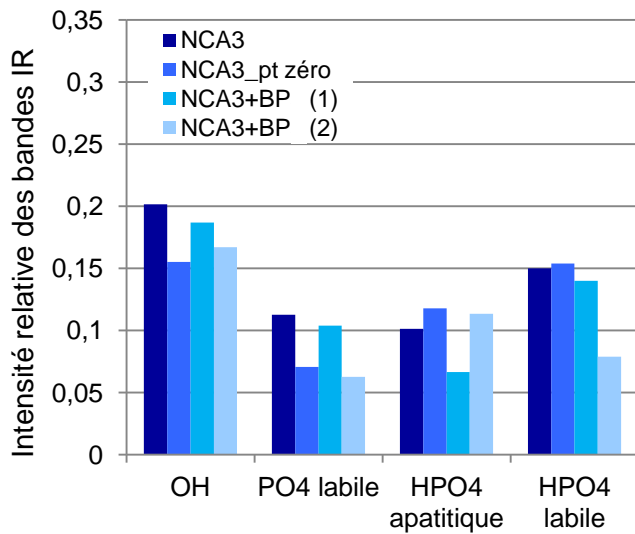
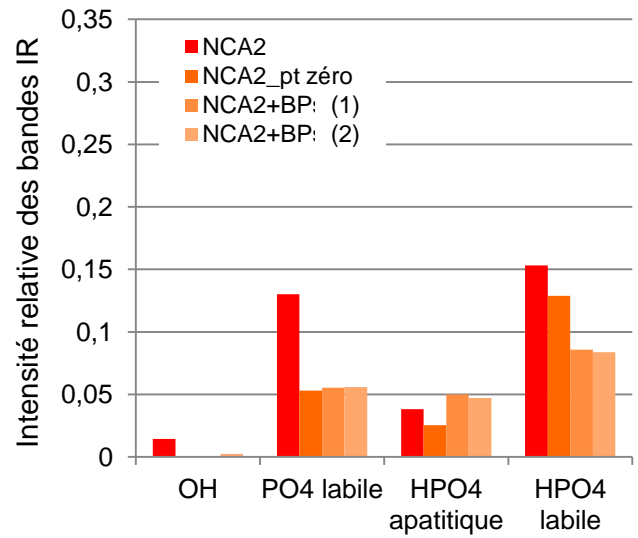
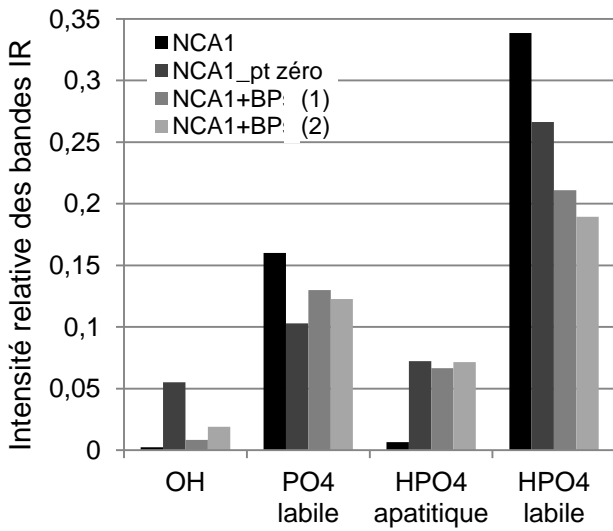


Figure 2-36:
Intensités relatives des bandes IR
 des groupements (hydrogène)phosphate labiles,
 hydrogénophosphate apatitique et hydroxyde
 des trois composés NCA1, NCA2 et NCA3 avant
 adsorption, pour les points zéro (NCAx_pt zéro) et
 après adsorption selon le traitement mathématique
 (1) (NCAx+BP(1)) et (2) (NCAx+BP(2))

Aussi, une analyse spectroscopique Raman a été réalisée en vue d'atteindre une meilleure distinction possible de ces bandes issues du tiludronate.

1.5.2.f. RAMAN

La figure 2-37 rassemble les spectres Raman des trois poudres NCA1, NCA2 et NCA3 après adsorption de tiludronate ainsi que ceux des poudres initiales NCA1, NCA2 et NCA3. Une normalisation de la bande vibrationnelle $\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1}) a été réalisée et les artefacts liés à l'appareillage ont été corrigés en vue de leur analyse comparative.

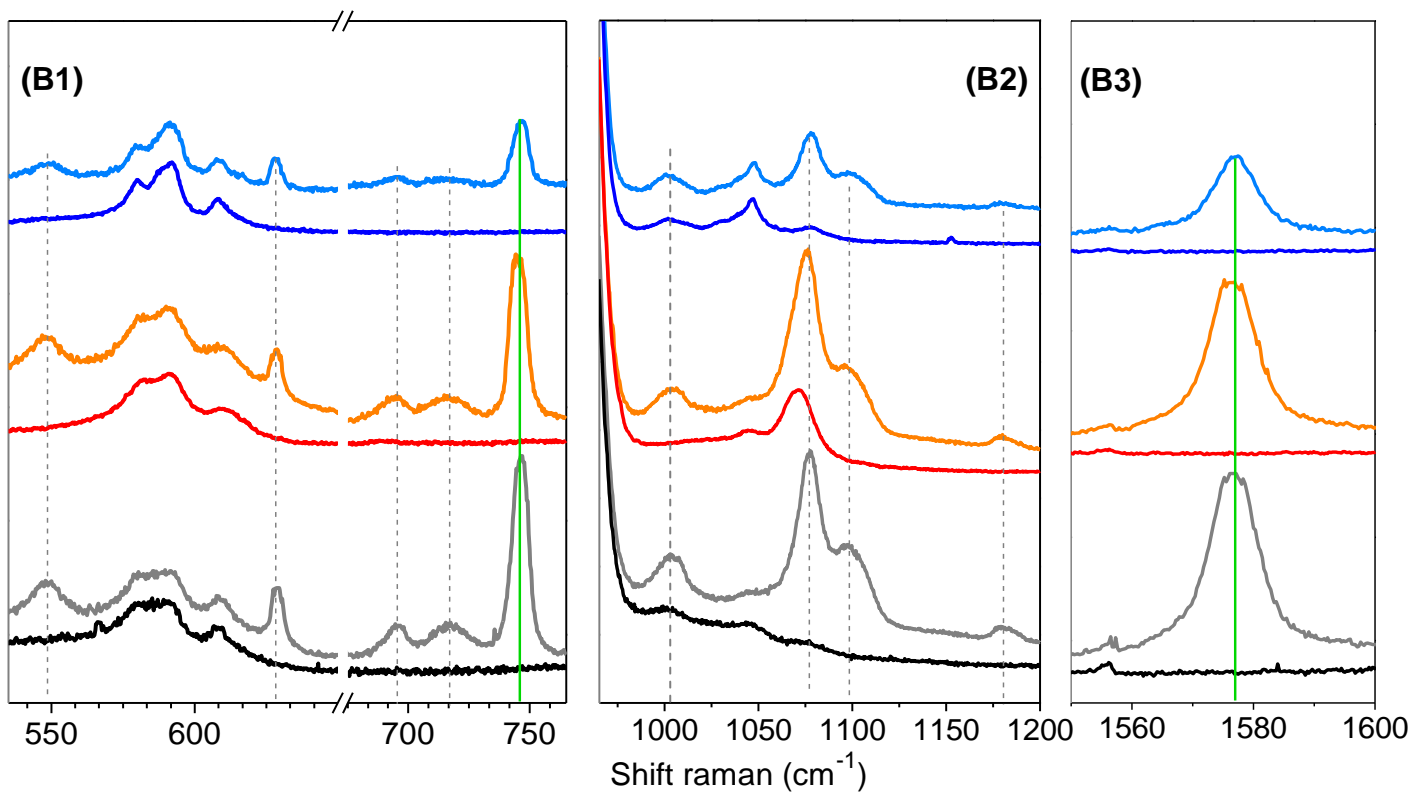
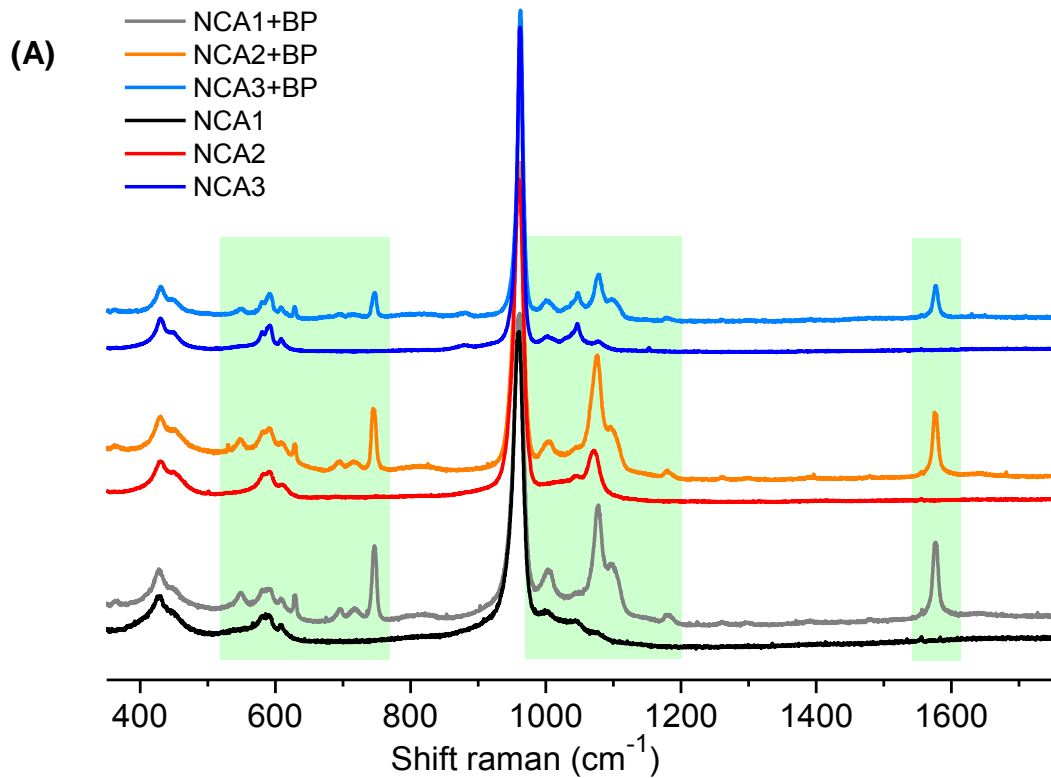


Figure 2-37: Spectres Raman des trois apatites nanocristallines biomimétiques synthétisées avec (NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP) et sans tiludronate (NCA1, NCA2 et NCA3)

(A) : spectres entiers ($350\text{-}1750\text{cm}^{-1}$)

(B1) : spectres focalisés sur la région $535\text{-}765\text{ cm}^{-1}$

(B2) : spectres focalisés sur la région $940\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$

(B3) : spectres focalisés sur la région $1550\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$

La technique d'analyse par spectroscopie confocale Raman semble mieux adaptée à l'observation des bandes vibrationnelles caractéristiques de la molécule de tiludronate. En effet, les bandes provenant uniquement de l'adsorption du tiludronate (tableau 2-11) apparaissent nettement. Ainsi, deux bandes intenses, présentes à 745 cm^{-1} et 1575 cm^{-1} attribuées au cycle, sont observées et se distinguent des bandes vibrationnelles issues des groupements phosphate du support apatitique. Les bandes de vibration des groupements phosphate et hydrogénophosphate n'ont quant à elles pas subi de variations ou alors des variations trop faibles pour être interprétées.

Le choix de la plage d'analyse est un paramètre important puisque dans la région spectrale $950\text{-}1200\text{cm}^{-1}$, la superposition des bandes Raman issues des composés synthétisés et du principe actif ne permet pas de connaître avec exactitude de façon quantitative l'impact de l'adsorption de tiludronate. Aussi, nous traiterons ultérieurement (C.I.5.3) les bandes vibrationnelles présentes dans les régions $535\text{-}765\text{ cm}^{-1}$ et $1550\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ pour une étude quantitative plus approfondie.

Une analyse par RMN du solide a été réalisée afin d'obtenir plus d'informations concernant l'interaction entre les molécules de tiludronate et les poudres NCA.

1.5.2.g. RMN solide

La figure 2-38 présentent les spectres RMN du phosphore obtenu en ^{31}P et en $^1\text{H}\rightarrow^{31}\text{P}$ CP MAS des trois apatites nanocristallines avant et après adsorption et pour les points zéro (sans tiludronate).

Les spectres NCA des points zéro possèdent les mêmes pics que les spectres NCA avec une largeur des pics moindre favorisant la distinction de deux épaulements nets sous le pic large dissymétrique observé à 3 ppm sur les spectres RMN du phosphore de NCA1 et NCA2. Cet affinement de la bande, plus prononcé pour NCA1, atteste de la maturation des poudres lors de leur mise en solution menant à des apatites mieux cristallisées.

Sur tous les spectres NCA+BP, l'adsorption du tiludronate sur les poudres engendre l'apparition d'un large pic centré autour de 16 ppm en plus du pic dissymétrique issu des groupements phosphate apatitiques. Notons que nous n'avons donc plus deux pics bien distincts à 15,2 ppm et 19,4 ppm (figure 2-16) comme dans le cas du sel de sodium mais un seul pic large à 16 ppm. En effet, la contribution du bisphosphonate est représentée par un pic à haute fréquence positionné en amont du pic du minéral osseux [Grossmann *et al.* 2000; Mukherjee *et al.* 2008; Ironside *et al.* 2010]. Un pic à 15 ppm d'une telle largeur a déjà été observé dans une précédente étude de Mukherjee *et al.* [Mukherjee *et al.* 2008] concernant

l'adsorption de plusieurs BPs sur le minéral osseux. La différence d'allure et d'aire de ce pic avec celui du sel de BP est attribuée selon l'auteur à la chimisorption de la molécule

De plus, selon les travaux de Grossmann *et al.* [Grossmann *et al.* 2000] portant sur l'adsorption de BPs sur l'hydroxyapatite, la largeur de ce pic suggère qu'il n'est pas lié à un BP cristallisé et semble en accord avec une molécule de bisphosphonate adsorbée.

Notons que l'acquisition des spectres par polarisation croisée (CP) favorise la réponse du BP quelle que soit la nature de l'apatite. En effet, la CP privilégie les noyaux de ^{31}P à proximité de protons. Ainsi, le tiludronate est mieux observé par CP. De plus, le temps de contact τ choisi a de l'importance puisque les transferts d'aimantation entre protons et ^{31}P dépendent notamment de la distance entre les noyaux et vont progressivement toucher des espèces de plus en plus éloignées lorsque le temps de contact augmente, la réponse des espèces fortement couplées est favorisée aux temps courts ($\tau=0,1\text{ms}$) alors qu'un temps de contact plus élevé ($\tau=3\text{ms}$) contribue à l'observation d'espèces moins couplées. Ainsi, le pic du BP est plus exalté dans le cas de CP avec $\tau=0,1\text{ms}$. De plus, remarquons que l'acquisition des spectres par polarisation croisée (CP) accentue la dissymétrie liée à la présence des HPO_4 quelle que soit la nature du composé.

Sur le spectre RMN ^{31}P MAS du composé NCA1+BP, on remarque une nette dissymétrie du pic à 3 ppm mettant en évidence un épaulement important aux bas champs, conséquence de la dominance des HPO_4 dans ce composé. Cette dissymétrie semble bien moins importante dans le cas du composé NCA2+BP.

Enfin, cette superposition (figure 2-39) nous permet de constater l'existence d'un léger décalage vers les bas champs magnétiques (la gauche) de ce pic sous l'effet de la maturation (NCA1 par rapport à NCA2). Eichert *et al.* ont déjà observé ce phénomène de manière plus significative et expliquent de façon logique que sous l'effet de la maturation le pic se rapproche de la position des groupements phosphates d'une apatite [Eichert 2001].

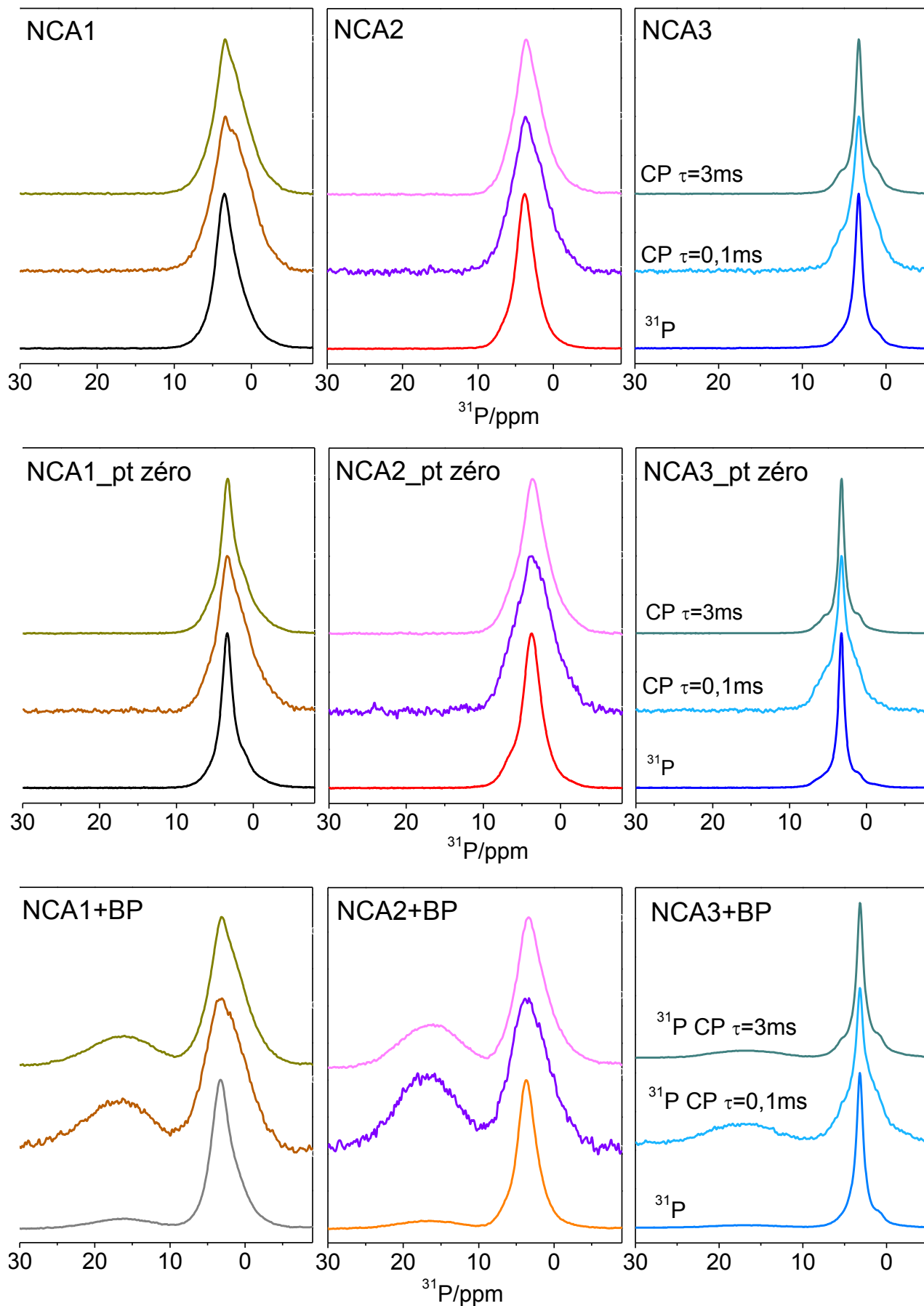


Figure 2-38 : Spectres RMN ^{31}P et $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS à deux temps de contact (t) : 0,1 ms et 3ms des apatites nanocristallines avant, au « point zéro » et après adsorption : NCA1, NCA2, NCA3, NCA1_pt zéro, NCA2_pt zéro, NCA3_pt zéro, NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP

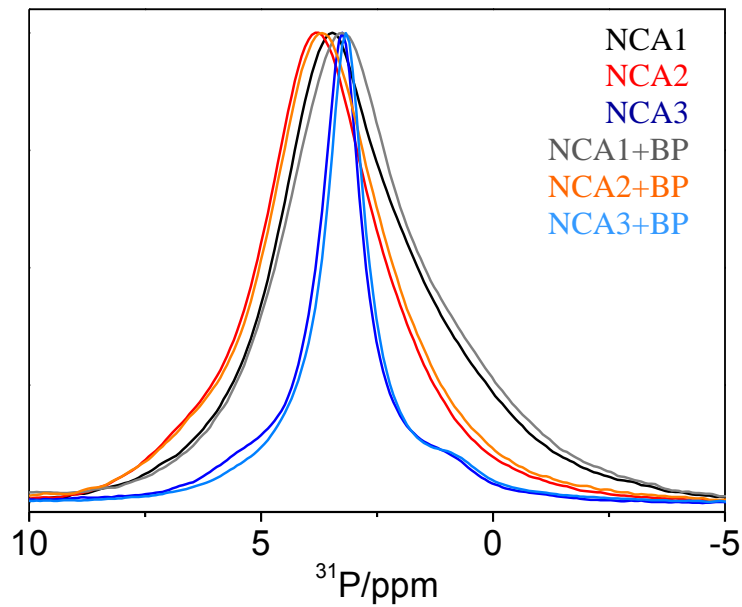


Figure 2-39 : Spectres RMN ^{31}P des apatites nanocristallines avant et après adsorption : NCA1, NCA2, NCA3, NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP

Les spectres RMN du proton des trois apatites nanocristallines obtenues avant adsorption, aux points zéro et après adsorption ainsi que celui du tiludronate sont exposés en figure 2-40.

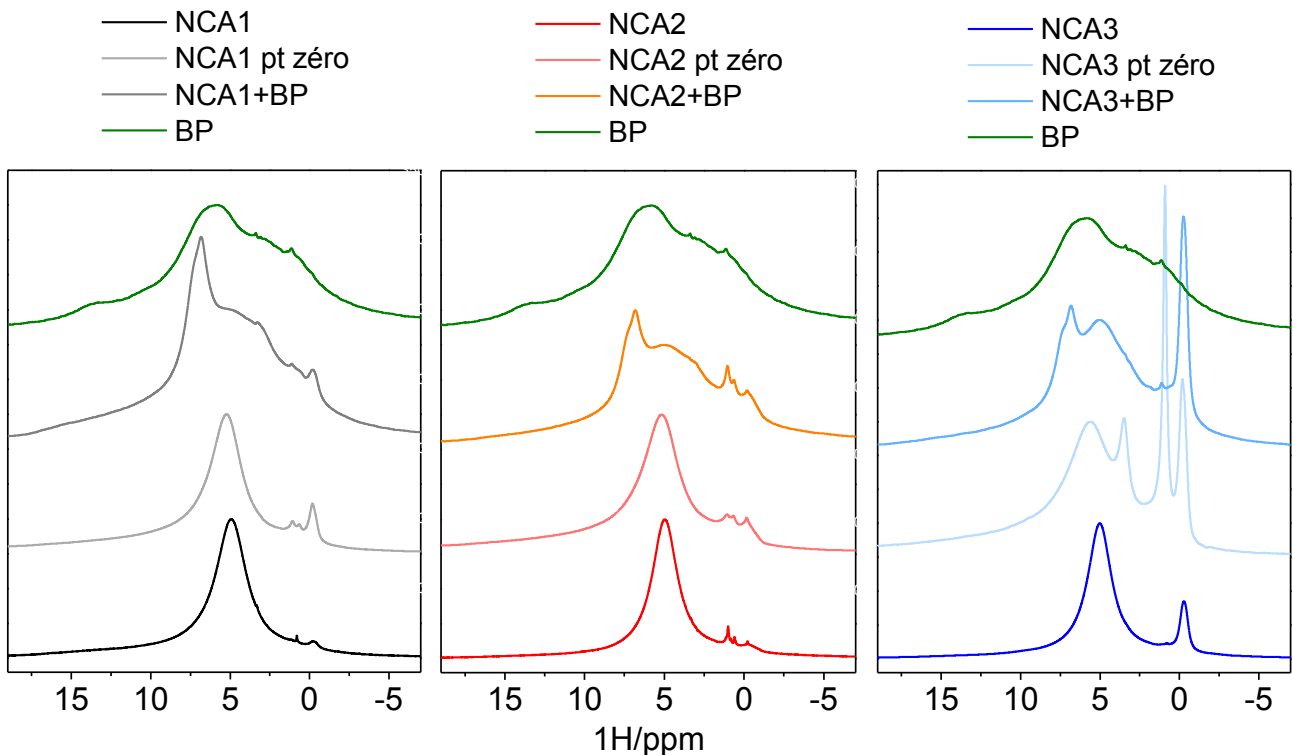


Figure 2-40 : Spectres RMN du proton du BP et des apatites nanocristallines avant adsorption : NCA1, NCA2 et NCA3 aux points zéro : NCA1 pt zéro, NCA2 pt zéro, NCA3 pt zéro et après adsorption de BP : NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP

Les spectres du proton des supports NCA_pt zéro mettent en évidence la présence d'un pic à 5,3 ppm translaté vers les champs faibles (la gauche) par rapport au pic observé à 5 ppm sur les poudres NCA initiales assignée à l'eau structurale, et l'exaltation d'un pic à -0,2 ppm attribué aux ions hydroxydes. Ces tendances mettent en évidence une maturation du support lorsque celui est réhydraté dans un milieu aqueux. Ces observations sont en accord avec de récents travaux [Vandecandelaere 2012] montrant que la réhydratation des apatites nanocristallines lyophilisées s'accompagne d'une accélération des phénomènes liés à la maturation. Le spectre NCA3_pt zéro, possède le pic à 1 ppm non systématique et mal interprété dans la littérature déjà observé pour NCA et NCA+BP mais dont l'intensité est grande pour cette acquisition et un pic à 3,45 ppm qui n'a pas été attribué.

Les spectres du proton des composés NCA+BP présentent tous un pic fin à 6,8 ppm, attribué aux protons aromatiques, assez différent en position et en résolution de celui observé pour le sel de sodium de la molécule (5,8 ppm). Un épaulement plus ou moins prononcé est observé à 4,9 ppm et 3,4 ppm respectivement caractéristique de l'eau restant dans la couche labile et du tiludronate et un pic plus ou moins intense à -0,2 ppm assigné aux ions hydroxydes. Notons que la technique de RMN du solide étant très sensible à ces derniers, le pic des hydroxydes apparaît de façon distincte même pour une faible quantité, c'est le cas pour NCA1+BP ou NCA2+BP.

Si on compare les spectres de NCA3_pt zéro et NCA3+BP, on observe que l'intensité relative du pic de l'eau (en prenant les hydroxydes en référence) est plus faible dans l'apatite chargée en tiludronate; la même observation peut être effectuée pour NCA2_pt zero et NCA2+BP bien que la bande OH⁻ de référence soit beaucoup moins intense. Pour NCA1_pt zéro et NCA1+BP également, il semble que la bande d'eau soit moins visible. Cette diminution du pic de l'eau de surface ne semble pas due à l'évolution de l'apatite mais elle pourrait être liée à l'adsorption du BP et à l'altération de la couche hydratée par l'incorporation d'une molécule hydrophobe. Si on admet cette interprétation, on peut en déduire que l'incorporation de tiludronate au précipité n'est pas due à un phénomène de déplacement chimique (dissolution de l'apatite et précipitation d'un tiludronate de calcium, amorphe, plus insoluble) mais que nous sommes bien en présence d'un phénomène d'adsorption qui altère la couche hydratée de l'apatite.

I. 5. 3. Quantification sur support apatitique

Dans la littérature, l'adsorption de bisphosphonates sur minéral osseux et/ou hydroxyapatite a été étudiée par la caractérisation du surnageant après adsorption principalement par chromatographie [Nancollas *et al.* 2006; Robinson *et al.* 2006; Lawson *et al.* 2010] ou RMN du liquide [Mukherjee *et al.* 2008], et par l'analyse du support après adsorption principalement par RMN du solide [Grossmann *et al.* 2000; Mukherjee *et al.* 2008; Ironside *et al.* 2010] et seulement quelques études ont été menées par spectroscopie Raman sur support solide [Juillard *et al.* 2010] bien que cette technique intéressante donne des informations complémentaires. L'étude menée par Juillard *et al.* [Juillard *et al.* 2010] à l'aide de la technique spectroscopique Raman concernant l'interaction entre le zolédronate et des apatites synthétique (hydroxyapatite) et biologique (fémur de rat) est une étude à la fois qualitative et quantitative. Le traitement mathématique détaillé utilisé permet notamment d'estimer de façon quantitative la concentration de principe actif. En se basant sur cette étude, nous avons mis en place une méthode de « dosage » à l'aide du spectroscope confocal Raman afin de quantifier le tiludronate sur les phosphate de calcium apatitiques mal cristallisés synthétisés.

Ainsi, cette méthode de dosage direct sur les supports apatitiques pourrait potentiellement permettre d'analyser de façon rapide et non destructive des fragments d'os traités au BP, afin de mieux connaître notamment la quantité de BP fixé sur les os.

I. 5. 3. a. Méthode de quantification par spectroscopie RAMAN sur solide

L'étude de la quantification de tiludronate sur NCA réalisée porte sur la poudre NCA1 puisque c'est le support qui possède la capacité d'adsorption la plus grande et donc la gamme de quantité adsorbée (Qads) la plus étalée. La gamme de Qads choisie pour l'étude a été préalablement quantifiée en dosant le BP résiduel dans surnageant après adsorption par spectroscopie UV (§ I.4.2) et elle est constituée de 5 échantillons étalons: 0,58; 1,33; 1,98; 2,47 et 2,64 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. Nous faisons ici l'hypothèse que le lavage et la lyophilisation de l'apatite n'altèrent pas la distribution du tiludronate. L'analyse par spectroscopie Raman a été répétée cinq fois dans les mêmes conditions (annexe) pour chacune des cinq poudres choisies (n=5). La gamme spectrale utilisée lors de l'acquisition est : 350-1750 cm^{-1} (figure 2-41) mais seules les régions spectrales : 650-875 cm^{-1} , 800-1200 cm^{-1} et 1500-1640 cm^{-1} feront l'objet d'un traitement mathématique de décomposition (figure 2-42) puisqu'elles comportent les bandes les plus intenses caractéristiques du principe actif (746 cm^{-1} et 1577 cm^{-1}) et/ou du support phosphocalcique (960 cm^{-1}). Le traitement de décomposition du support phosphocalcique a été réalisé à l'aide du logiciel *Labspec/Horiba JobinYvon* et en nous basant sur les travaux existants [Penel *et al.* 1998]. Notons qu'une bande supplémentaire observée à

909 cm^{-1} attribuable aux vibrations des liaisons P-OH a du être ajoutée pour le traitement mathématique. De plus, des bandes spécifiques assignées au tiludronate (tableau 2-11) ont du être prises en compte dans le but d'améliorer la précision du traitement mathématique. Pour les deux régions, 650-875 cm^{-1} et 1500-1640 cm^{-1} , exemptes de composés phosphocalcique [Penel *et al.* 1998] nous avons repris les attributions des bandes caractéristiques du sel disodique du tiludronate (tableau 2-11).

La figure 2-41 montre les spectres Raman normalisés de l'apatite NCA1 par rapport à la bande $\nu_1\text{PO}_4$ à 960 cm^{-1} avec les différentes quantités de tiludronate adsorbées. Ils mettent bien en évidence la tendance des bandes du tiludronate (745 cm^{-1} et 1575 cm^{-1}) à croître proportionnellement avec Q_{ads} .

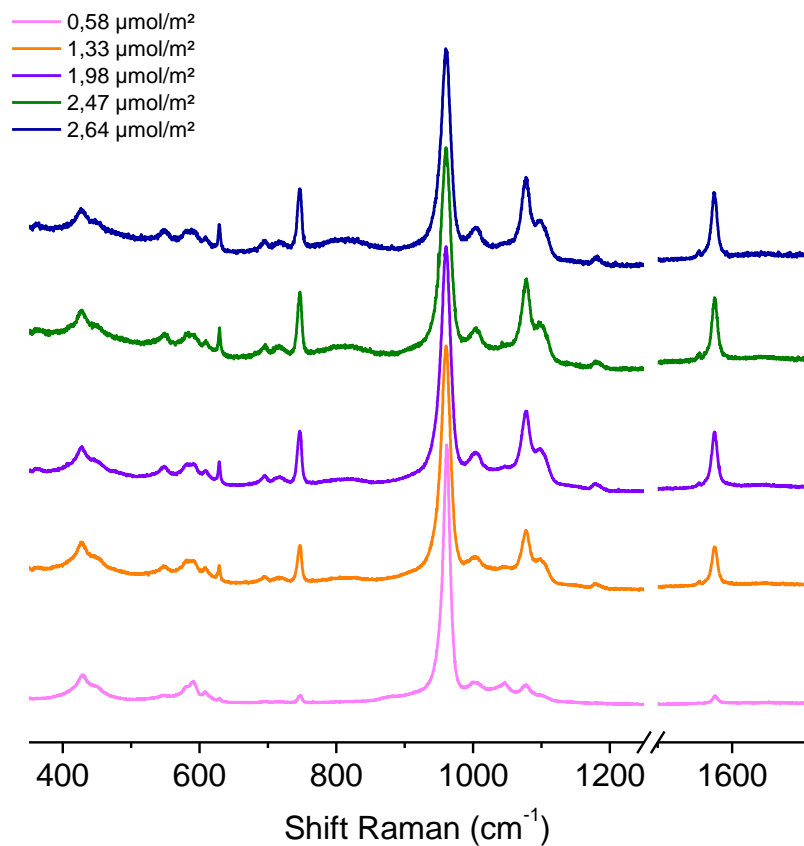


Figure2-41: Spectres Raman de l'apatite NCA1 avec différentes quantités de tiludronate adsorbées (Q_{ads}) : 0,58; 1,33; 1,98; 2,47 et 2,64 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$

Aussi afin de quantifier cette tendance, nous avons choisi d'extraire des spectres le rapport d'intensité bandes de vibrations du BP à 745 cm^{-1} et 1575 cm^{-1} attribuées à $\nu\text{C-S}$ et au $\nu\text{C=C}$ dans le plan par rapport à la bande issue du support apatitique présente à 960 cm^{-1} attribuée à $\nu_1\text{PO}_4$. Ces rapports on été tracés en fonction de Q_{ads} soit :

$$\frac{\text{Aire}_{BP}(745\text{cm}^{-1})}{\text{Aire}_{NCA}(960\text{cm}^{-1})} = f(Q_{ads}) \qquad \frac{\text{Aire}_{BP}(1575\text{cm}^{-1})}{\text{Aire}_{NCA}(960\text{cm}^{-1})} = f(Q_{ads})$$

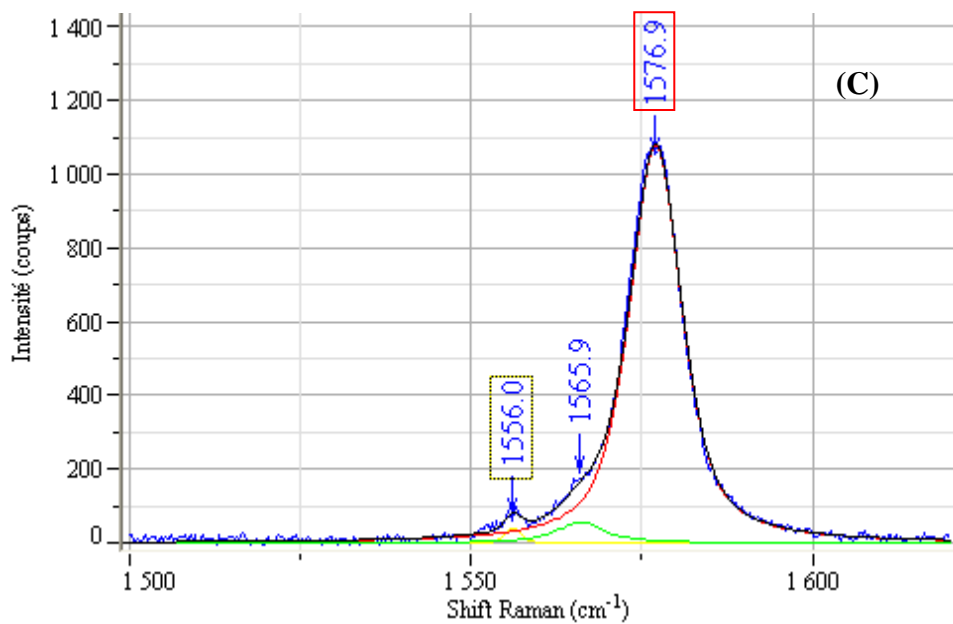
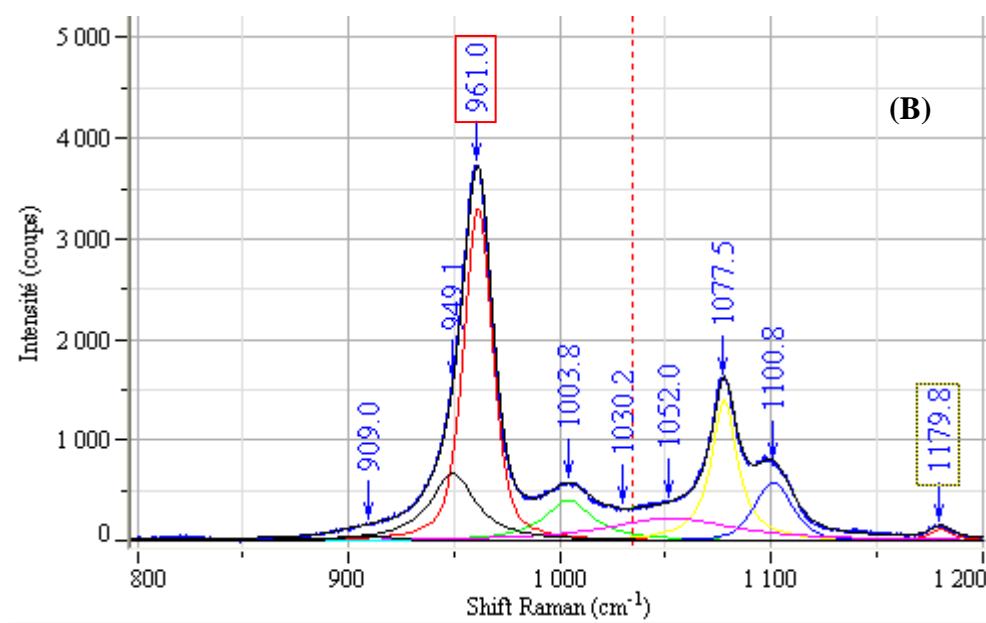
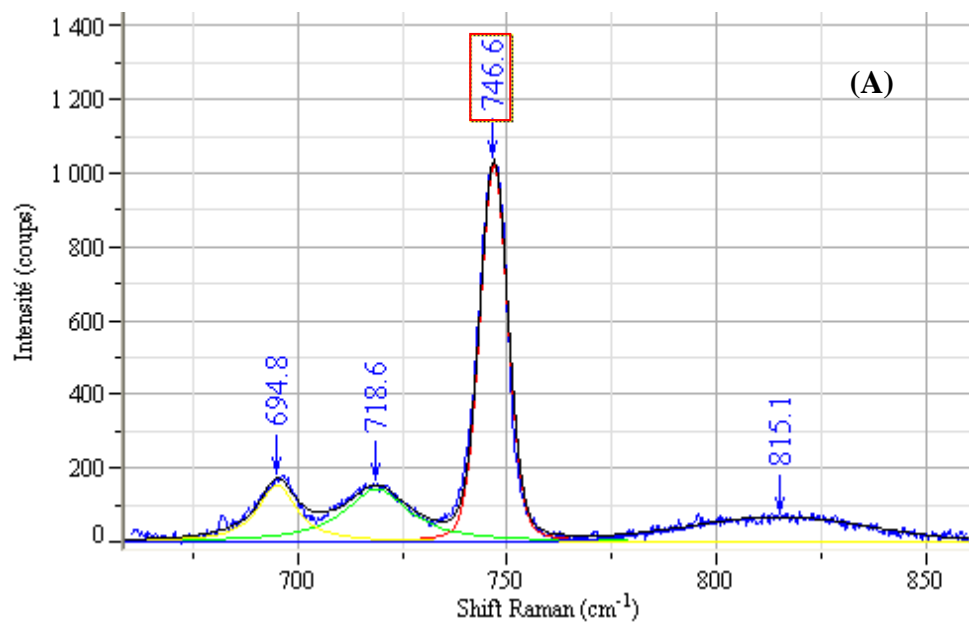


Figure 2-42:
Décompositions des bandes Raman.
 Exemple de l'échantillon avec Qads = 2,64 μmol/m².
 Spectres focalisés sur les régions :

- 650-875 cm⁻¹ (A),
- 800-1200cm⁻¹ (B)
- 1500-1640 cm⁻¹ (C)

Une droite d'étalonnage (figure 2-43) a pu être tracée en vue d'un dosage direct sur solide de la quantité de tiludronate adsorbé.

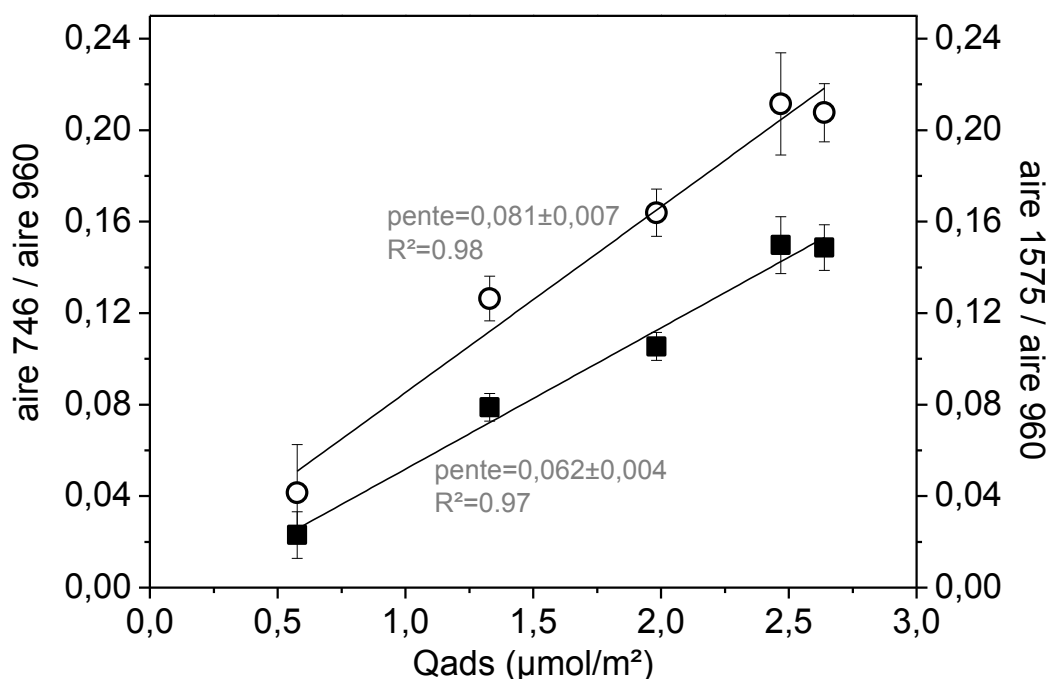


Figure 2-43 : Intensités relatives des bandes IR des groupements assignés au tiludronate (746 cm⁻¹ ○ et 1577 cm⁻¹ ■) en fonction de la quantité de tiludronate adsorbée

Les résultats montrent que les rapports d'intensité entre les bandes à 745 cm⁻¹ et 1575 cm⁻¹ et celle de la bande 960 cm⁻¹ sont proportionnels à la quantité de tiludronate adsorbée sur le support apatitique. En effet, les droites d'étalonnage présentent respectivement une pente de 0,081 et 0,062 μmol/m². La proportionnalité a ainsi pu être vérifiée et la droite d'étalonnage a pu être établie par cette méthode. Il serait donc en principe possible d'évaluer la présence de tiludronate dans les tissus ou les biomatériaux apatitiques dans le domaine de concentrations exploré avec une résolution micrométrique.

Ainsi, cette méthode permet un dosage semi-quantitatif du principe actif sur solide de façon rapide et précise. Elle pourrait être potentiellement utilisée à des visées de diagnostic clinique.

Maintenant que la faisabilité de cette méthode est validée, la perspective de cette étude serait la détermination du rapport des intensités de façon automatique et statistique à l'aide d'un logiciel type *TQAnalyst* par exemple.

II. Cinétiques de libération

II. 1. Libération de molécules d'intérêt biologique

L'ajout de molécules d'intérêt biologique sur des supports implantables en vue de leur libération contrôlée et locale à des fins thérapeutiques est sujet à de nombreuses études.

La libération de biomolécules à partir de supports peut être régulée selon Ji *et al.* [Ji et al. 2012] par différents mécanismes, seuls ou combinés (figure 2-44) : (a) la désorption, (b) la diffusion, (c) la dégradation du support et (d) via des stimuli externes.

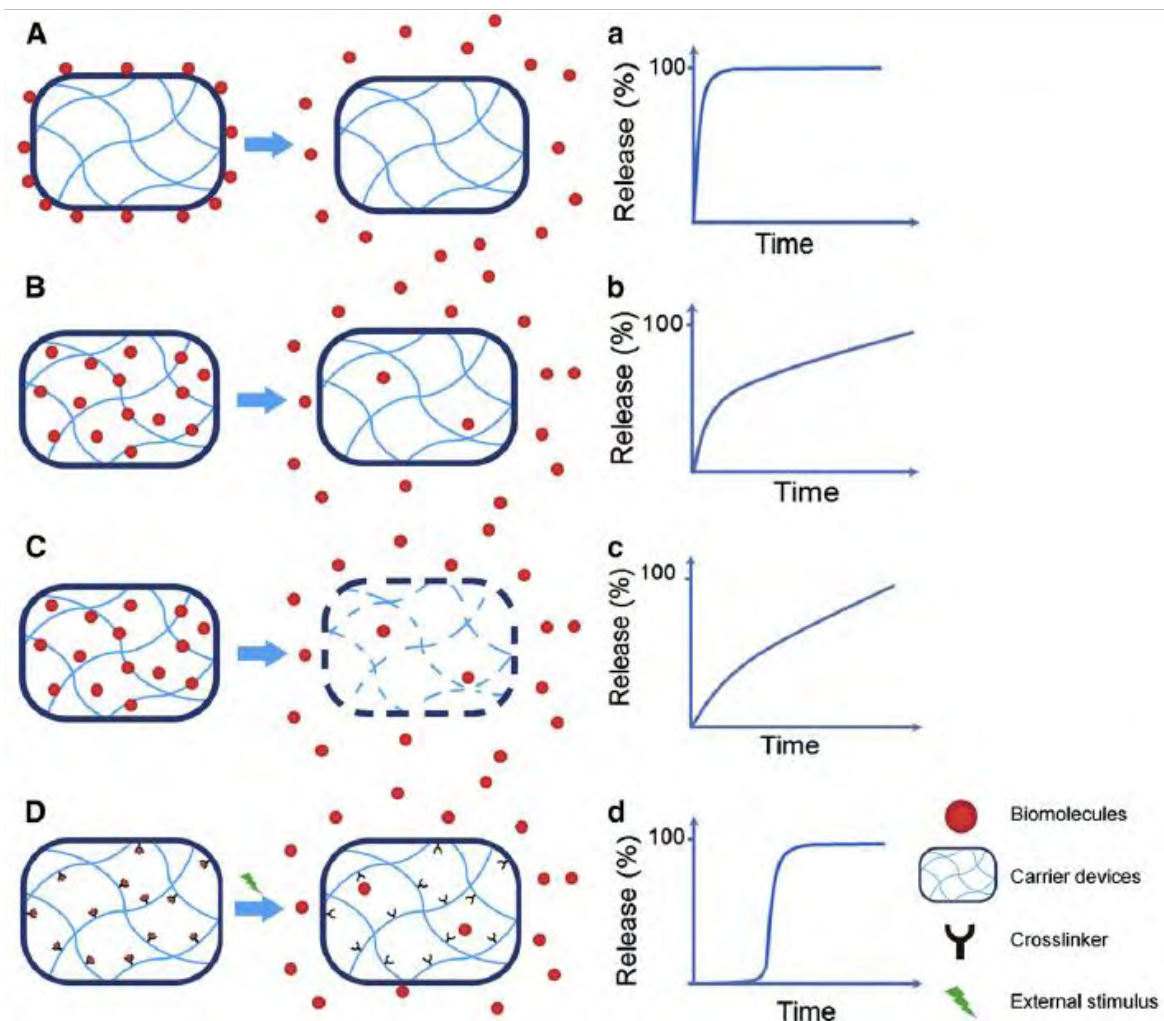


Figure 2-44: Représentation schématique des différents mécanismes de libération de biomolécules à partir de supports [Ji *et al.* 2012] – Le « release » correspond au pourcentage de BP libéré -

De nombreux types de substrats ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études pour leur aptitude à la libération de substances thérapeutiques. Parmi ceux-ci les phosphates de calcium, grâce à leur propriété de biocompatibilité, leur composition chimique proche du minéral osseux et à leurs multiples possibilités de mise en forme (ciments, céramiques, granules...), représentent un support de choix pour la délivrance locale de molécules d'intérêt biologique.

Depuis les années 90, un grand nombre de travaux décrivant différents types d'associations phosphate de calcium/principe actif sont décrits dans la littérature. Ainsi, l'association d'agents thérapeutiques telle que la cisplatine avec des phosphate de calcium mal ou bien cristallisés [Barroug *et al.* 2004] et des céramiques phosphocalciques [Uchida *et al.* 1992] ; la conjugaison d'antibiotiques tels que la gentamycine, la vancomycine et l'ampicilline avec des ciments phosphocalciques [Bohner *et al.* 1997; Hamanishi *et al.* 1998], une apatite déficiente en calcium [Obadia *et al.* 2003] et une hydroxyapatite [Queiroz *et al.* 2001] ; l'incorporation de facteurs de croissance à des apatites phosphocalciques [Guicheux *et al.* 1997; Midy *et al.* 1998; Autefage 2009 b] en est un autre exemple. Toutefois, si la plupart de ces exemples portent sur l'étude des procédés d'association ou d'incorporation et/ou sur la nature des interactions molécules/supports, la majorité de ces études ne détaille pas ou peu le mécanisme de libération impliqué dans ces associations.

Parmi les molécules d'intérêt thérapeutiques qui présentent un ou des avantages à être libérées à partir d'un support, se trouvent notamment plusieurs composés de la famille des BP. En effet, une libération ciblée et contrôlée de BP permettrait notamment d'augmenter la biodisponibilité du principe actif dans l'organisme et de diminuer les effets secondaires recensés à ce jour observés par voie systémique (voie orale, intraveineuse) [Coleman 2008; Coleman *et al.* 2011]. Ainsi, l'alendronate, une molécule de BP, a été associée avec des systèmes de type matriciel tels qu'une matrice hydrophile à base de polymère [Ochiuz *et al.* 2010] ou un matériau mesoporeux ordonné à base de silice [Balas *et al.* 2006] afin de permettre sa libération locale. Dans le cas de ces deux études, le mécanisme de libération identifié est un processus de diffusion des molécules de BP à travers la matrice.

De plus, les molécules de BP ayant une grande affinité pour les phosphates de calcium, leur association a donné lieu à des études sur leur libération. Par exemple, la libération de l'alendronate a été étudiée à plusieurs reprises, par Shi *et al.* [Shi *et al.* 2009] à partir de microsphères composites à base de polymère (PLGA) et d'hydroxyapatite chargées en BP, par Palazzo *et al.* [Palazzo *et al.* 2007] à partir d'apatite nanocristalline ayant préalablement adsorbée les molécules de BP. Les travaux de Faucheux *et al.* [Faucheux *et al.* 2009] et de Roussière *et al.* [Roussière *et al.* 2008] portent, quant à eux, sur l'étude de la désorption de zolédronate lorsqu'il est préalablement chargé sur une apatite déficiente en calcium et du β TCP. De plus, l'étude de Palazzo *et al.* utilise les apatites nanocristallines en tant que supports apatitiques puisqu'ils possèdent une chimie plus proche de celle du minéral osseux.

La plupart des études de libération sont liées à une utilisation thérapeutique d'associations BP-phosphates de calcium. Il paraît important de déterminer les mécanismes de libération ou de non-libération qui seraient responsable d'une accumulation du médicament dans l'organisme.

Dans ce travail, nous avons étudié la cinétique et le mécanisme de libération des molécules de tiludronate préalablement adsorbées sur trois apatites nanocristallines différentes (NCA1, NCA2 et NCA3) afin de mieux appréhender la libération du BP au contact des cellules osseuses. Cette étude a été réalisée en collaboration avec la composante pharmacie galénique de la faculté de pharmacie de Toulouse, rattachée à notre équipe.

II. 2. Mode opératoire

L'étude de la cinétique de libération a été réalisée à l'aide d'un appareil de dissolution apparente équipé de cellules à flux continu, présentées en figure 2-45.

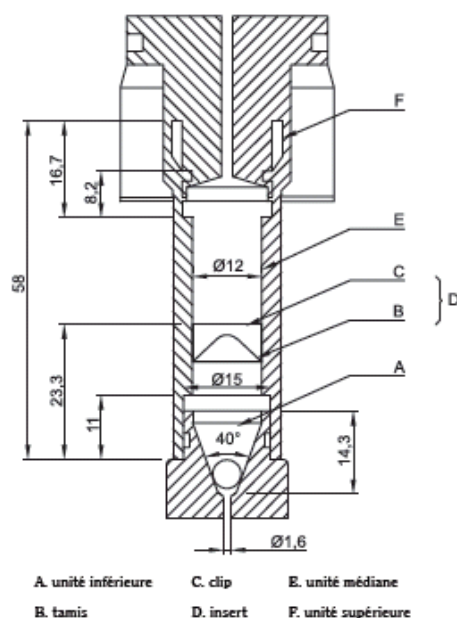


Figure 2-45: Cellule à flux continu d'un appareil de dissolution apparente [2008]
Les dimensions sont exprimées en millimètres

Cette méthode a été choisie car son utilisation permet de déterminer la vitesse de dissolution/libération de substances actives dans des préparations présentées sous forme de poudres ou de granules selon la Pharmacopée Européenne [2008] et l'appareil utilisé satisfait à ces normes.

Dans notre cas, ce dispositif nous permet d'établir la cinétique de libération des molécules de tiludronate préalablement adsorbées sur des poudres d'apatites nanocristallines : NCA1, NCA2 et NCA3 dans un milieu aqueux.

Le montage du dispositif utilisé est schématisé en figure 2-46. La nature du milieu aqueux circulant dans le circuit fermé à flux continu est de l'eau ultrapure (type eau milli-Q); le débit du flux est de 15mL/min, le volume du circuit fermé est de 50mL pour un volume de cellule de 25mL et la température du bain thermostaté est de 37°C. Une masse de 100mg de poudre d'apatites nanocristallines a été insérée dans chaque cellule. Notons que les conditions SINK sont respectées [2008] c'est à dire que nous nous sommes assurés de travailler avec un rapport poudre/solution tel que la concentration de BP libérée en solution tout au long de l'expérience

reste inférieure à la concentration à saturation afin de pallier au phénomène de saturation du milieu qui fausserait la cinétique de libération.

L'adsorption des molécules de tiludronate sur les poudres NCA1, NCA2 et NCA3 répond au protocole précédent avec un milieu d'adsorption concentré à 2g/L de tiludronate soit $Q_{ads} = 2,47 \text{ mM}$, 1,99 mM et 1,55 mM pour NCA1, NCA2 et NCA3 respectivement. Les poudres apatitiques NCA1, NCA2 et NCA3 sans BP ont aussi été soumises à cette étude à titre d'échantillon de référence. Les essais ont été tripliqués pour chaque composition.

A intervalles réguliers, nous avons prélevé 5mL de milieu dans le flacon de prélèvement que nous avons aussitôt renouvelé par 5mL d'eau ultrapure afin de conserver un volume constant dans le circuit. Les milieux prélevés et filtrés sur millipore ($\varnothing=0,2\mu\text{m}$) sont dosés par spectrophotométries UV et ICP-AES afin de déterminer respectivement la quantité de molécules de tiludronate libérée et la teneur en ions calcium et phosphate présents dans le milieu pour chaque temps : $t_{\text{prélèvement}}$.

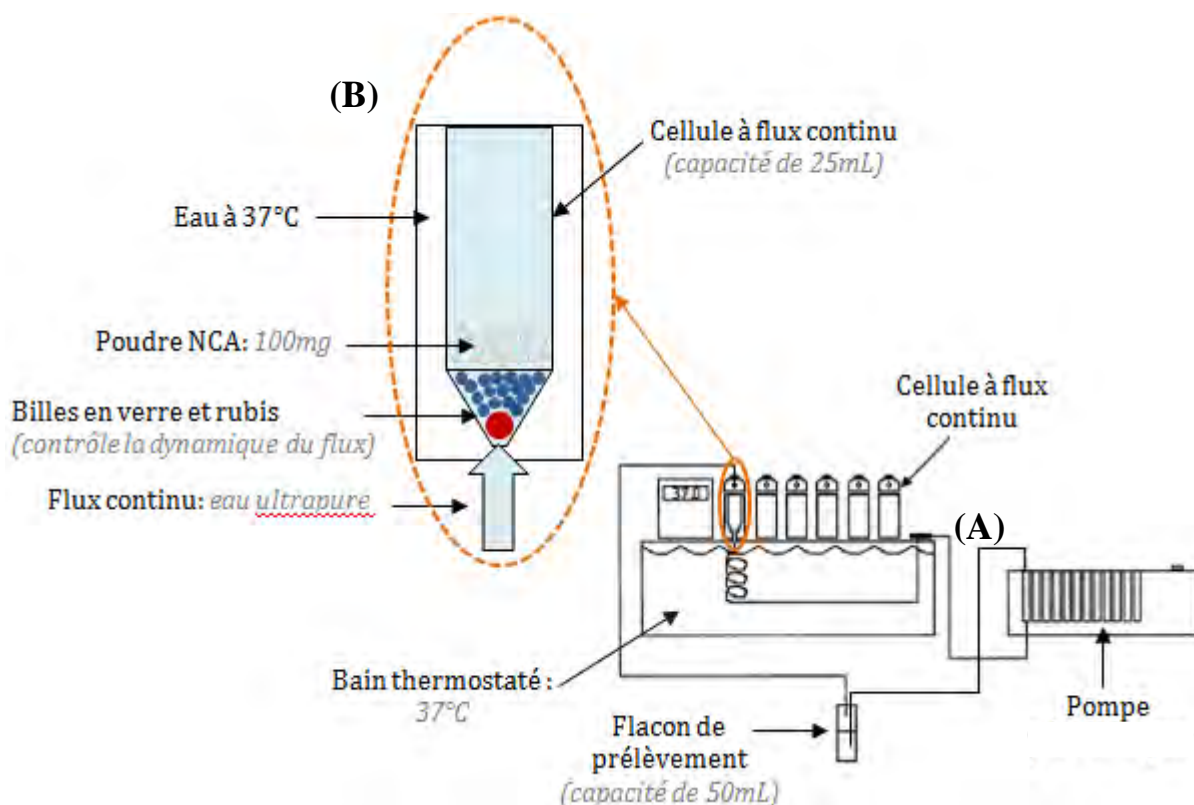


Figure 2-46: Représentation schématique du montage de l'appareil de dissolution apparente (A) (Adapté de [Queiroz *et al.* 2001]) équipé de six cellules à flux continu (B)

II. 3. Résultats

II. 3. 1. Cinétique de libération des molécules de tiludronate

Les mesures par spectrophotométrie UV à $\lambda=265\text{nm}$ ont permis de déterminer la concentration en tiludronate libérée (Q_r) dans l'eau ultrapure à partir des poudres NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP. Les résultats sont exprimés en cumulatif et sont présentés en figure 2-47 sous la forme d'une cinétique.

Les cinétiques de libération obtenues pour ces mêmes poudres sont exposées en figure 2-48 et sont exprimées en pourcentage de molécules de tiludronate libéré en fonction du temps selon la formule :

$$BP_{libéré}(\%) = 100 \times \frac{Q_{r\text{ cumul}}}{Q_{ads}} \quad (12)$$

Les cinétiques de libération de BP mettent en évidence un profil similaire pour les trois supports sur les 4 premières heures que l'on peut scinder en plusieurs parties (figure 2-47 A et 2-48 A) dont la première (1) est une libération immédiate importante de BP dès les premiers instants de la cinétique et la deuxième (2) est une libération modérée entre 1h et 4h. Toutefois, après 4h des différences de cinétique entre les trois poudres NCA sont observées. La cinétique de libération de NCA1 montre un ralentissement à partir de 4h s'apparentant à un palier tandis que la cinétique de libération de NCA2 croît continuellement jusqu'à la fin de l'expérience. Le passage récurrent de la poudre NCA3 dans le circuit fermé ayant été observé lors des multiples cinétiques de NCA3 après quatre heures d'essai, l'expérience n'a pas pu être poursuivie après 4h. Nous avons par ailleurs observé un changement de l'aspect des poudres avec le temps d'expérience qui se traduit notamment pour NCA1 par la formation d'une masse gélatineuse, alors que ce phénomène est moins apparent pour les autres apatites nanocristallines.

La quantité libérée Q_r cumulée à la fin de l'étude plus élevée pour le support NCA1 que pour les supports NCA2 et NCA3 est en adéquation avec la quantité adsorbée : Q_{ads} . Les figures 2-47 et 2-48 montrent que la quantité de molécules de tiludronate libérée en solution à partir d'une apatite non maturée (NCA1) est faible, de l'ordre de $2,5\mu\text{mol/L}$ soit 5-6% de la quantité adsorbée initialement. Pour les apatites maturées, l'incertitude sur les données acquises après 4 heures ne nous permet pas de savoir si la quantité de tiludronate libéré correspond à un équilibre.

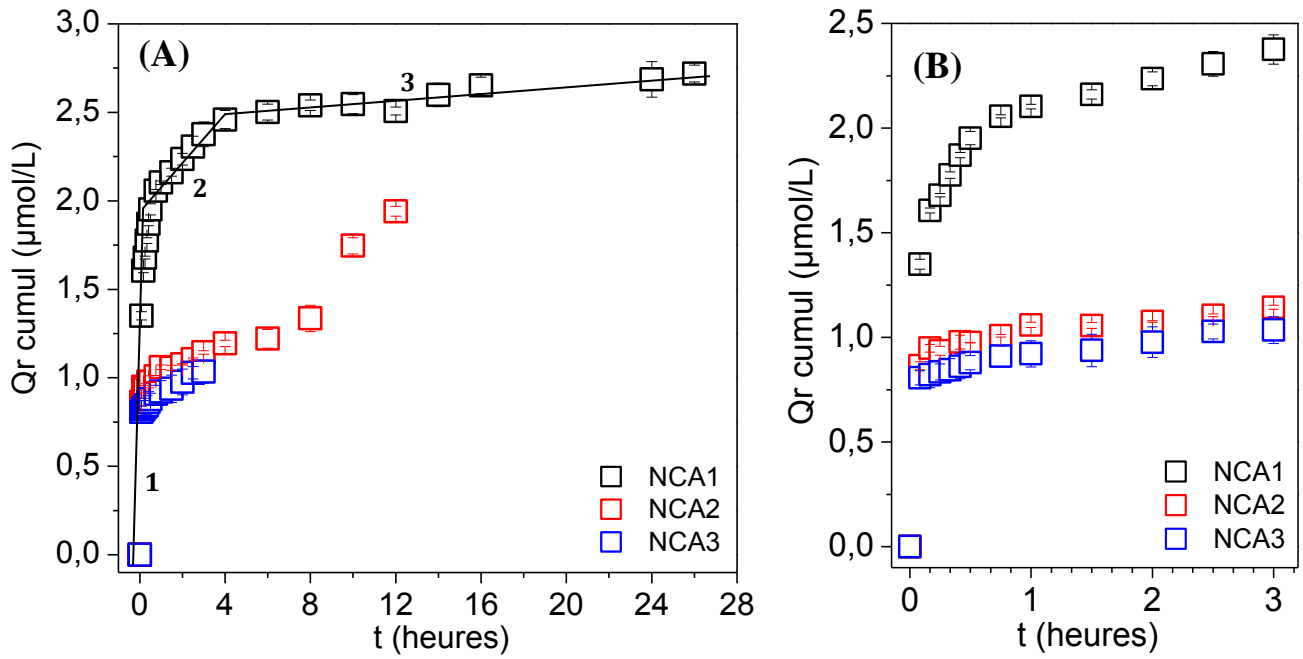


Figure 2-47: Cinétique de la concentration cumulée de tiludronate libérée pour la totalité de l'expérience (A) et pour les 3 premières heures (B)

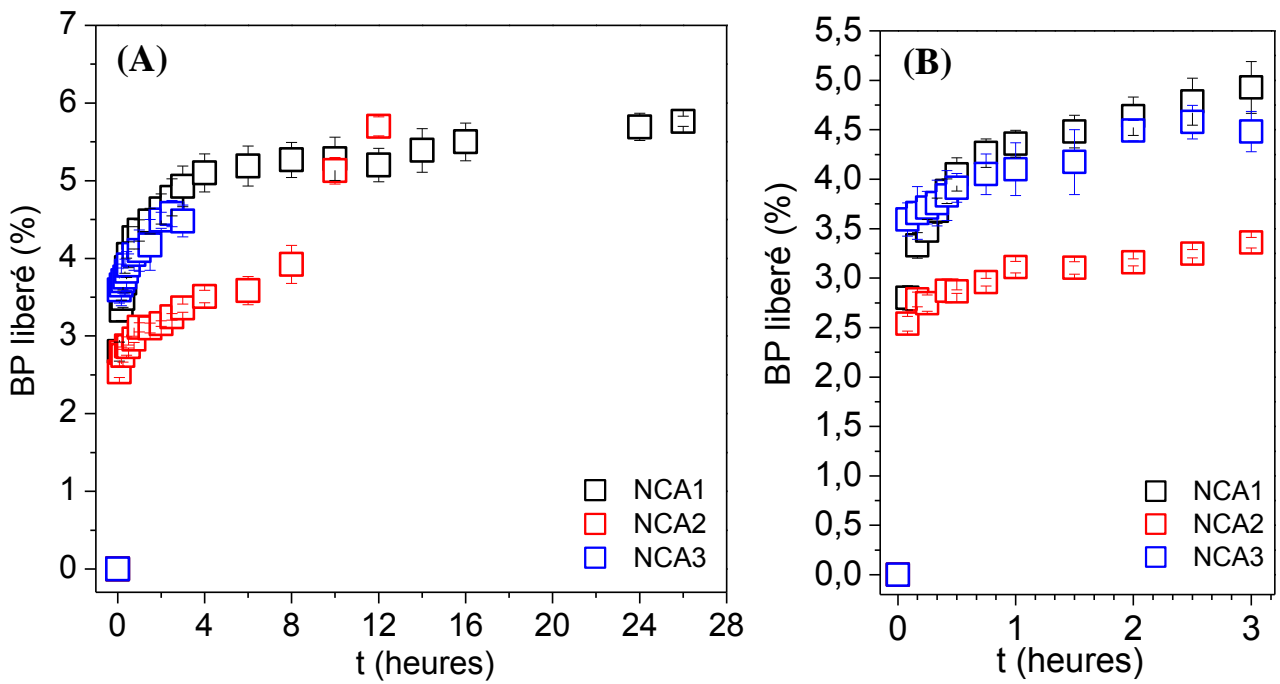


Figure 2-48: Cinétique de libération cumulée des molécules de tiludronate sur l'intégralité de l'expérience (A) et sur les 3 premières heures (B)

II. 3. 2. Mécanisme de libération

Les principaux mécanismes de cinétique de libération de molécules actives utilisées en pharmacie galénique sont régis par différents modèles mathématiques en fonction de la nature de la libération [Costa *et al.* 2001; Dash *et al.* 2010]. Nous avons appliqué cinq de ces modèles mathématiques à notre étude afin de mieux identifier le mécanisme de libération des molécules de tiludronate à partir d'apatites nanocristallines biomimétiques. Les cinq modèles appliqués ainsi que leurs expressions mathématiques et la nature du mécanisme correspondant sont répertoriés dans le tableau 2-14.

Modèles	Equation	Représentation graphique	Nature du mécanisme
Ordre zéro	$Q_{r\text{cumul}} = Q_{ads} + K_0 \times t$ avec K_0 : constante ordre 0	$BP_{\text{libéré}}(\%) = f(t)$	Libération <i>indépendante de la concentration</i> de substance dissoute
Premier ordre	$\log Q_{r\text{cumul}} = \log Q_{ads} + \frac{K_1 \times t}{2,303}$ avec K_1 : constante ordre 1	$\log BP_{\text{libéré}}(\%) = f(t)$	Libération <i>dépendante de la concentration</i> de substance dissoute
Hixson-Crowell	$3\sqrt{Q_{ads}} - 3\sqrt{Q_{r\text{cumul}}} = K_{HC} \times t$ avec K_{HC} : constante de Hixson-Crowell	$3\sqrt{Q_{ads}} - 3\sqrt{Q_{r\text{cumul}}} = f(t)$	Libération par <i>dissolution</i> accompagnée d'un changement de surface spécifique et du diamètre des particules
Higuchi	$Q_{r\text{cumul}} = K_H \times t$ avec K_H : constante de Higuchi	$Q_{r\text{cumul}} = f(t)$	Libération par <i>diffusion</i>
Korsmeyer-Peppas	$Q_{r\text{cumul}}/Q_{ads} = K_{KP} \times t^n$ avec K_{KP} : constante de Korsmeyer-Peppas n : paramètre de diffusion	$\log BP_{\text{libéré}}(\%) = f(\log t)$	Libération par <i>diffusion</i> Si $n=0,45$: <i>diffusion selon loi de Fick</i>

Tableau 2-14: Détails de cinq modèles mathématiques régissant les mécanismes de cinétique de libération

La figure 2-49 regroupe les représentations graphiques du modèle mathématique de premier ordre, de Hixson-Crowell et Korsmeyer-Peppas tandis que les modèles d'ordre zéro et de Higuchi sont présentés en figure 2-48 et 2-47 respectivement. Nous avons appliqué ces modèles aux cinétiques de libération obtenues pour NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP et la non linéarité de chacune de ses représentations graphiques sur l'ensemble de la cinétique est observée. Néanmoins, on remarque une linéarisation lors la première heure avec le modèle de Hixson-Crowell correspondant à une libération par diffusion, mais le modèle n'est plus linéaire au-delà de la première heure. De plus, notons qu'avec le modèle Korsmeyer-Peppas

(figure 2-49 C), une linéarité se dessine pour NCA3 toutefois les valeurs ayant été reportées uniquement pour les quatre premières heures nous ne pouvons conclure d'un phénomène de diffusion sur la totalité de l'expérience (24 heures). De plus, la pente de cette droite est égale à $0,072 \pm 0,006$ et ne correspond pas à la gamme de valeurs de n établies dans la littérature ($0,45 \leq n \leq 0,89$) [Costa *et al.* 2001; Dash *et al.* 2010]. Aussi, le phénomène de libération du tiludronate, quel que soit le modèle NCA, ne semble ni associé à un phénomène de dissolution ni à un phénomène de diffusion, en tout cas de manière pure. Aussi, une possible concomitance de différents phénomènes est envisagée.

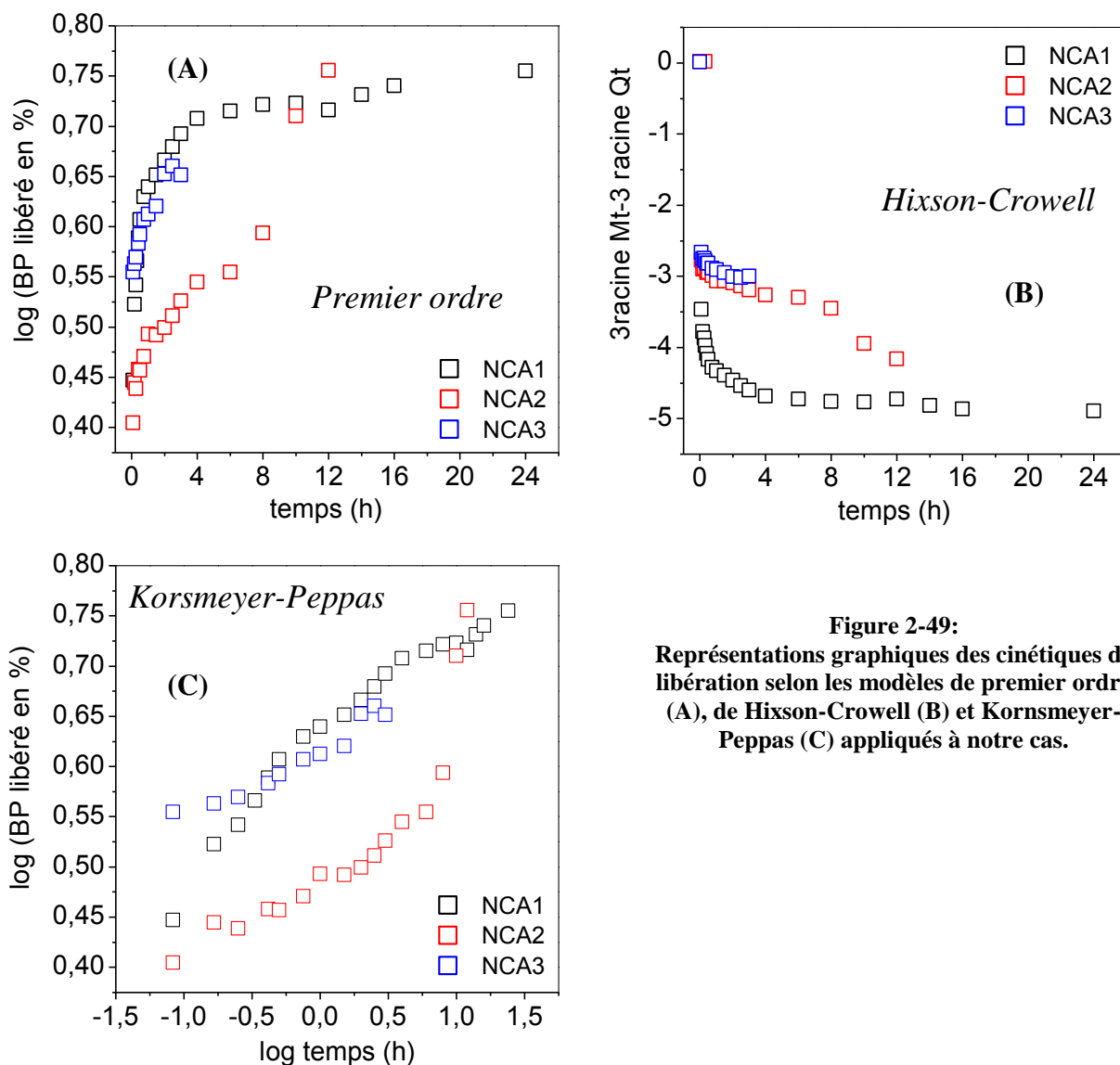


Figure 2-49:
Représentations graphiques des cinétiques de libération selon les modèles de premier ordre (A), de Hixson-Crowell (B) et Korsmeyer-Peppas (C) appliqués à notre cas.

II. 3. 3. Dosage des ions calcium et phosphate libérés en solution

Lors de la mise en contact du flux avec nos poudres apatitiques biomimétiques, divers phénomènes peuvent se produire : la mise en équilibre de dissolution des apatites, les échanges éventuels liés à la désorption, et d'autres réactions de surface impliquant les ions calcium et phosphate qui modifient la concentration des ions minéraux en solution. Le dosage des ions calcium et phosphate en solution réalisé par analyse ICP-AES aux différents temps de prélèvements aussi bien pour les supports avec BP que sans BP fera l'objet de cette partie. La concentration en ions phosphates minéraux a été déterminée par différence entre la concentration totale des ions phosphates présents en solution dosée par analyse ICP-AES et la concentration calculée en phosphates issue de la libération du tiludronate en solution dosée par spectrophotométrie UV.

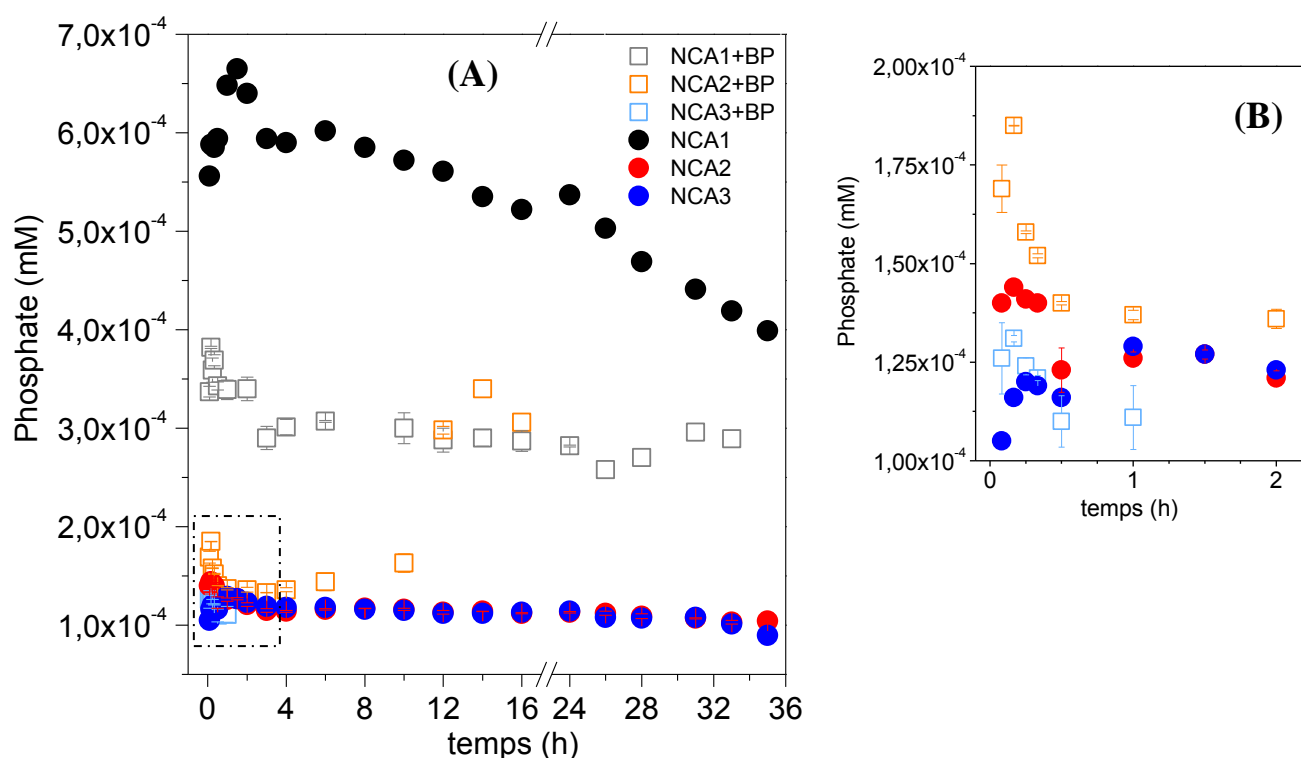


Figure 2-50: Evolution de la concentration en ions phosphates minéraux présents en solution tout au long de l'expérience (A) et sur les deux premières heures de libération (B)

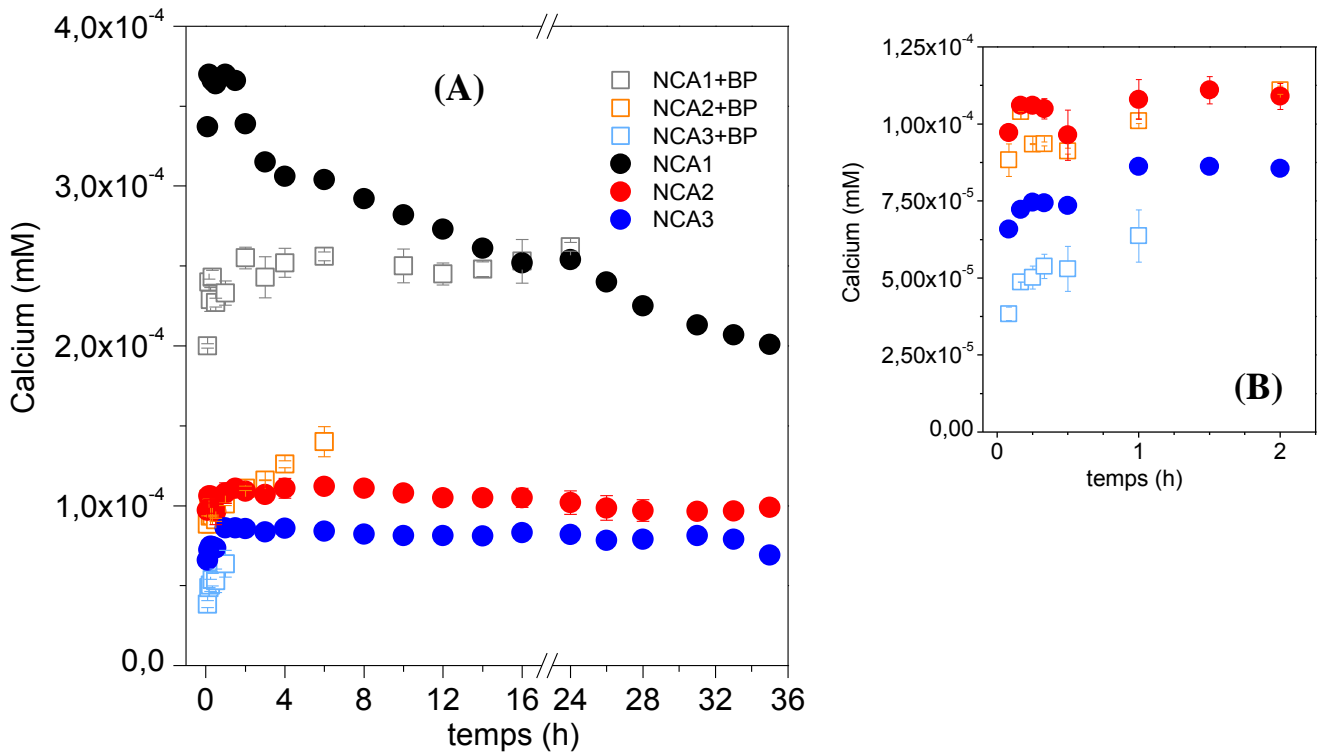


Figure 2-51: Evolution de la concentration en ions calcium présents en solution tout au long de l'expérience (A) et sur les deux premières heures de libération (B)

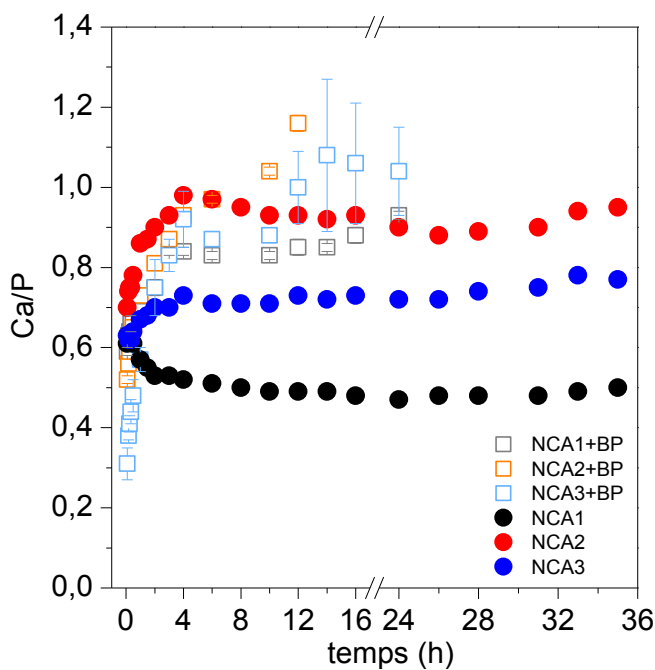


Figure 2-52: Evolution du rapport atomique Ca/P en solution des supports NCA1, NCA2, NCA3, NCA1+BP, NCA2+BP et NCA3+BP tout au long de l'expérience

Les résultats des cinétiques de libération des ions minéraux en solution (figures 2-50 et 2-51) mettent en évidence deux types d'évolution : le support NCA1 présente un profil différent par rapport aux supports maturés NCA2 et NCA3, sans et avec BP.

Les cinétiques de libération des ions calcium et phosphate en solution montrent que l'équilibre de solubilité des apatites dans l'eau ultrapure est atteint au bout de quelques heures. Elles mettent en évidence deux types d'évolution : le support NCA1 présente un profil différent par rapport aux supports maturés NCA2 et NCA3, sans et avec BP. Les concentrations des ions minéraux en solution restent assez faibles bien qu'elles apparaissent nettement plus élevées dans le cas de la poudre NCA1 par rapport aux deux supports NCA2 et NCA3. Ces résultats peuvent être reliés à la solubilité plus élevée de NCA1, apatite non maturée, par rapport à NCA2 et NCA3 maturés 1 mois, et aussi à la concentration en BP à saturation plus élevée pour NCA1 comme vu précédemment.

On peut noter au début de la mise en solution, pour les 3 poudres, avec ou sans BP, un profil identique durant les 4 premières heures: une augmentation rapide en ions phosphate et calcium, suivie d'une baisse ou stabilisation (figures 2-50 B et 2-51 B). Ce phénomène, accompagné de l'observation de la formation d'un gel lors de l'analyse, pourrait être attribué à la réhydratation de la couche hydratée, en particulier pour le support NCA1. Il est à relier avec la mise en solution rapide de calcium et de phosphate et la libération des BP en solution.

Pour les supports NCA1 ce phénomène est suivi d'une baisse progressive de la concentration en ions phosphate et calcium en solution, initialement très élevée (figure 2-51). Le rapport Ca/P des espèces dissoutes est très faible et bien inférieur à celui du solide. Ce phénomène de dissolution non-congruente sera commenté dans le chapitre suivant. Si on suppose qu'un équilibre de solubilité est rapidement atteint pour ces poudres la baisse des concentrations en solution pourrait indiquer une diminution continue du produit de solubilité avec le temps, qu'on peut être tenté de relier à un phénomène de maturation et, effectivement, les concentrations en phosphore et calcium de NCA1 semblent se rapprocher progressivement de celles obtenues avec les apatites maturées.

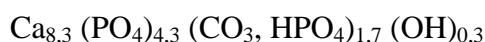
Concernant les supports maturés NCA2 et NCA3, on observe une libération d'ions calcium et phosphate qui atteint rapidement un équilibre. Le rapport Ca/P des ions en solution (figure 2-52) apparaît cependant beaucoup plus faible que celui du solide (entre 0.5 et 1). Ce phénomène sera commenté dans le chapitre suivant. Notons que NCA2 étant plus soluble que NCA3 du fait de la présence des carbonates [LeGeros *et al.* 1984], les concentrations de

calcium en solution sont plus élevées pour NCA2 et les concentrations en phosphates sont probablement associées à la libération d'ions carbonates.

Les profils des cinétiques de libération des poudres NCA2 et NCA3 avec BP n'apparaissent pas fondamentalement différentes de ceux sans BP si on exclut les variations erratiques observées au début de la réaction de libération. La cinétique de libération des ions phosphate et calcium est peu influencée par la présence des BP pour ces supports maturés. Il est à noter une augmentation à partir de 10h de la concentration en ions phosphates, calcium et en BP en solution corrélée avec une augmentation du rapport atomique Ca/P pour ces deux supports. Ces augmentations sont attribuées à un passage des poudres dans les flacons de prélèvement aussi bien pour NCA2 que pour NCA3 qui fausserait les dosages (phénomène observé plusieurs fois lors de l'analyse et difficile à inhiber). Concernant NCA1+BP, une élévation nettement moins importante de la teneur initiale en calcium et phosphate est observée et la concentration en phosphates minéraux libérés en solution diminue fortement par rapport au support sans BP (de $6.10^{-4}M$ à $3.10^{-4}M$ à t_0) ainsi que celle en calcium ($3,5.10^{-4}M$ à $2.5.10^{-4}M$ à t_0), laissant suggérer que la mise en solution initiale est ralentie en présence de molécules de BP adsorbées. Par ailleurs, si au bout d'une douzaine d'heures les concentrations en calcium de NCA1 et NCA1+BP se rejoignent, la concentration en phosphate reste nettement inférieure pour NCA1+BP. Il est difficile d'attribuer la diminution en ions phosphates par rapport à NCA1 sans BP à un phénomène d'échange ionique « inverse » entre les phosphates minéraux en solution issus de la dissolution de l'apatite et les BP adsorbés sur le support, car la différence de la teneur en phosphate entre l'apatite chargée et non chargée est de l'ordre de 10^{-4} mole/L alors que la libération de tiludronate est de l'ordre de 10^{-6} mole/L. Cette explication n'est donc pas acceptable. Une autre possibilité serait la perturbation du phénomène de maturation de cette apatite en raison de la présence du tiludronate et ce point mériterait d'être étudié.

D. Discussions

La phase minérale du tissu osseux est définie comme une apatite déficiente en calcium carbonatée de type B contenant des ions hydrogénophosphate [Legros 1984] dont la formule générale est :



Avec l'âge, le minéral osseux évolue et subit des changements de composition et de structure de sa phase solide ; ce phénomène est souvent appelé « maturation ». Il est attribuable en fait à deux mécanismes, une évolution physico-chimique des apatites nanocristallines et le remodelage osseux (voir chapitre 1). Lors du remodelage, un nouvel os jeune se forme introduisant de nouveaux jeunes cristaux tandis que les plus vieux cristaux sont résorbés. Au cours du temps les cristaux nouvellement déposés subissent une maturation purement physico-chimique et voient leurs caractéristiques changer. L'email dentaire et la dentine ne sont pas affectés par le remodelage, et leur évolution paraît essentiellement liée à une maturation physico-chimique. Si on étudie les premiers stades de développement de différents tissus, l'email, le cartilage calcifié et l'os, la composition chimique des jeunes cristaux d'apatites déposés est relativement semblable et différente de celle des cristaux matures. Rey *et al.* [Rey *et al.* 1995] dans leur étude menée sur des apatites biologiques : email de cochon, cartilage de veau et os de poulet, présentent ces différences. Les cristaux d'apatite jeunes, c'est-à-dire les premiers déposés sur les tissus biologiques, sont mal cristallisés et présentent une faible teneur en carbonates, une teneur en PO_4 et un rapport $\text{Ca}/(\text{P}+\text{C})$ faibles mettant en évidence le caractère non stœchiométrique des apatites déposées, une teneur élevée en HPO_4 en accord avec les travaux de Legros *et al.* [Legros *et al.* 1986] ainsi qu'une absence de OH^- . Les ions carbonates et les groupements phosphate sont présents en majorité dans un environnement labile [Rey *et al.* 1995]. Les cristaux initiaux de la phase phosphocalcique minérale sont similaires quel que soit leur site de déposition (email, os,...). Lors de la maturation de ces cristaux, une augmentation de la cristallinité, de la taille des cristallites et du rapport Ca/P est observée. En effet, si l'on se réfère à quelques chiffres, les travaux de Kuhn *et al.* [Kuhn *et al.* 2008] mettent en évidence les évolutions existantes entre l'os trabéculaire et cortical bovin jeune et mature sur la taille des cristaux et le rapport Ca/P . La longueur des cristaux du minéral osseux cortical et trabéculaire jeune (1-3 mois), définie selon le plan (002), est respectivement de 186 Å et 145 Å alors qu'elle est de 195 Å et 188 Å pour un os mature (4-5 ans). Notons que le rapport Ca/P du minéral osseux cortical et trabéculaire d'un jeune bovin est respectivement de 1,51 et 1,61 tandis qu'il est de 1,58 et 1,64 pour un os

mature. Rey *et al.* [Rey *et al.* 1995] expose des rapports Ca/P du minéral osseux du poulet allant de 1,46 pour un os embryonnaire de 17 jours à 1,70 pour un os mature (1 an) alors que l'émail du cochon présente un rapport Ca/P allant de 1,40 pour les premiers cristaux formés à 1,59 pour un émail mature [Rey *et al.* 1991; Aoba 1993]. Toutefois, notons que les cristaux évoluent de façon différente pour l'os et pour l'émail lors de la maturation. L'évolution dans l'os se traduit par une augmentation de la teneur en carbonates, une constance du rapport Ca/(P+C) et de la teneur en OH⁻ et une diminution de celle des groupements HPO₄, et plus particulièrement des HPO₄ labiles, et des ions labiles carbonates. La maturation de l'émail, contrairement à celle de l'os, engendre une diminution de la teneur en carbonates et une augmentation de celle en ions OH⁻ et du rapport Ca/(P+C). Ainsi, la maturation aboutit à deux types de cristaux présentant notamment des différences: de taille, de cristallinité et de propriétés physico-chimiques, permettant de répondre *in-vivo* à des fonctions biologiques différentes.

En effet, notons ici comment les propriétés physico-chimiques de ces apatites nanocristallines ont su adapter leurs caractéristiques à la fonction biologique. Pour le minéral osseux, renouvelable et qui a un rôle dans l'homéostasie, les apatites restent nanocristallines riches en ions bivalents et sous-stœchiométriques avec une solubilité relativement élevée. Alors que pour l'émail dentaire, composite le plus dur de l'organisme, composé pour 96% de minéral cristallin qui au contraire n'est pas ou peu renouvelé et qui doit résister aux dissolutions acides induites par la nourriture ou les bactéries de la flore buccale, la simple réduction de la proportion d'ions carbonate conduit à des apatites relativement proches de la stœchiométrie et beaucoup moins solubles.

Dans notre étude, trois apatites de synthèse: NCA1, NCA2 et NCA3 ont été élaborées comme modèles osseux en modulant la maturation et la présence des ions carbonates. Le phosphate de calcium apatitique synthétisé: NCA1 (non carbonaté et non mûré) est nanocristallin, mal cristallisé et possède des caractéristiques de taille (148Å le long et 28Å de large) et de composition (teneur en carbonates et en PO₄ faibles, un rapport Ca/(P+C) faible, teneur élevée en HPO₄, absence d'ions hydroxyles) proches de celles des apatites biologiques. Les autres phosphates de calcium apatitiques synthétisés: NCA2 et NCA3 sont quant à eux mûrés. La maturation de ces apatites de synthèse engendre notamment une augmentation du rapport atomique Ca/P et de la taille des cristallites, une diminution de la surface spécifique et un affinement des pics de diffraction attestant de la

tendance de l'apatite à se transformer en une apatite mieux cristallisée. Toutefois, l'effet de la maturation diffère selon qu'on se trouve en présence ou en l'absence d'ions carbonate. Aussi, deux composés NCA2 et NCA3 ont été synthétisés. En l'absence d'ions carbonates (NCA3), l'évolution des bandes IR, plus particulièrement les bandes attribuées aux HPO_4 labiles et apatitiques et l'accroissement des bandes OH^- témoignent de la diminution relative des ions de la couche hydratée au profit de la couche apatitique qui évolue vers une apatite de plus en plus proche de la stœchiométrie, en conformité avec les travaux précédemment publiés [Rey *et al.* 1995; Ouizat *et al.* 1999]. Alors qu'en présence d'ions carbonates (NCA2), l'évolution vers la stœchiométrie n'est plus observée, ces ions pénètrent dans la structure apatitique où ils se substituent majoritairement aux ions hydrogénophosphate et, si le rapport Ca/P augmente en raison de cette substitution, le rapport Ca/(P+C) lui, ne varie pas (1,38-1,39). Les carbonates présents dans les apatites nanocristallines sont en partie de type A et majoritairement de type B. En outre, on note une dimension réduite des domaines apatitiques comparée au cas de l'apatite maturée en l'absence de carbonates. Ces observations sont bien en adéquation avec la propriété d'inhibiteur de croissance cristalline démontrée pour les ions carbonates dans la littérature [Posner 1969]. Notons par ailleurs que la diminution relative des ions HPO_4^{2-} apatitique par rapport à l'apatite maturée en l'absence de carbonates, semble confirmer la substitution de ces ions par des ions carbonates. Toutefois la proportion globale d'ions bivalents (carbonates et hydrogénophosphate) reste nettement supérieure dans ces apatites maturées en présence de carbonate à ce qu'elle est dans les apatites maturées en l'absence de carbonate, comme le montre le rapport Ca/(P+C).

Ainsi, la similitude entre les apatites nanocristallines synthétisées : NCA1, NCA2 et NCA3 et les apatites biologiques est avérée. Aussi, NCA1 peut être considéré comme un analogue des cristaux du minéral osseux jeune, NCA2 comme un analogue de cristaux du minéral osseux mature et NCA3, qui a été introduit dans l'étude à fin de comparaison avec l'apatite maturée et carbonatée pour évaluer le rôle de la carbonatation, peut être comparé aux cristaux matures d'email. Dans cette étude, trois modèles distincts d'apatites biologiques ont donc été développés.

Il est à noter que les apatites phosphocalciques nanocristallines biomimétiques synthétisées possèdent, comme le minéral osseux, une couche de surface hydratée caractéristique, constituée d'ions faiblement liés ce qui leur confère une certaine mobilité ionique. Les ions issus de cette couche vont ainsi pouvoir être facilement échangés avec les

ions environnants ou des petites molécules créant des réactions d'échanges ioniques [Neuman *et al.* 1968]. Les réactions d'échange ionique conférées par la présence de la couche hydratée mettent en jeu des échanges aussi bien anioniques que cationiques. Ces réactions sont rapides et quelques minutes suffisent à atteindre l'équilibre de réaction. Les cations et les anions bivalents sont les ions les plus concernés par ces échanges. Par exemple, les anions hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}) sont ainsi remplacés par les carbonates dans la couche labile lorsque ceux-ci sont présents en solution [Rey *et al.* 1995; Rey *et al.* 2007] et les cations divalents Mg^{2+} ou Sr^{2+} en solution se substituent au calcium de la couche hydratée dans une proportion « 1-1 » [Drouet *et al.* 2008]. Cette mobilité de surface est influencée par la nature des ions, la maturation et la composition de l'apatite [Rey *et al.* 2007]. En effet, lors de la maturation, la couche hydratée diminue au profit d'un domaine apatitique plus stable, affectant ainsi la capacité d'échange ionique. Toutefois, la présence dans cette couche de carbonates ou d'autres ions tels que le magnésium, qui sont des inhibiteurs de croissance cristalline de l'apatite, ralentissent considérablement cette évolution et stabilisent relativement la couche hydratée favorisant ainsi les réactions d'échange ionique. Notons que les ions de la couche hydratée peuvent suivant leur nature être incorporés ou non dans les domaines apatitiques des nanocristaux en croissance au cours de la maturation. Ainsi les ions carbonates de la couche hydratée sont progressivement incorporés à la phase apatitique tandis que les ions magnésium qui s'incorporent difficilement à la phase apatitique restent majoritairement dans la couche hydratée et demeurent donc échangeables [Cazalbou 2000]. Il apparaît ainsi possible d'aboutir à un biomimétisme élaboré en contrôlant à la fois le temps de maturation et la composition de la couche hydratée. Dans cette étude, nous avons plus particulièrement considéré l'effet des ions carbonate dont l'effet sur le minéral osseux est bien établi.

Depuis quelques années, les apatites nanocristallines biomimétiques ont prouvé leur grande affinité pour les macromolécules biologiques grâce à leur propriétés particulières (cristallinité, taille et morphologie des cristallites, présence de la couche labile,...) qui favorisent la « fixation » de ses molécules [Barroug *et al.* 2004; Barroug *et al.* 2008]. Aussi, ces composés font de plus en plus l'objet d'études sur l'adsorption de macromolécules d'intérêt biologique telles que le facteur de croissance [Autefage *et al.* 2009 a] ou des substances actives : anti-cancéreux [Barroug *et al.* 2004] ou anti-ostéoporotique [Errassifi *et al.* 2009].

Les réactions d'adsorption sont gouvernées par différents modèles mathématiques dont seul le modèle de Langmuir n'est pas empirique.

Dans la littérature, l'adsorption de molécules d'intérêt biologique est principalement effectuée sur des composés phosphocalciques généralement bien cristallisés, notamment l'HA stœchiométrique ou proche de la stœchiométrie et est modélisée par des isothermes de Freundlich, Langmuir-Freundlich et Töth ou Langmuir. Ainsi, différents modèles mathématiques peuvent décrire l'adsorption de molécules d'intérêt biologique sur des composés phosphocalciques selon les conditions utilisées. En effet, une récente étude comparative des différents modèles appliqués à l'adsorption de phosphonates sur une HA stœchiométrique de Rill *et al.* [Rill *et al.* 2009] définit les isothermes de Langmuir-Freundlich et Töth comme modèles les plus appropriés. Josse *et al.* lors de l'adsorption de molécules de BP sur les composés apatitiques à base de β TCP et d'un mélange β TCP-HA considèrent une adsorption de type Freundlich [Josse *et al.* 2005].

Néanmoins, le modèle de Langmuir reste le plus utilisé pour interpréter les interactions entre les molécules actives et l'HA [Ouzat *et al.* 1999; Nancollas *et al.* 2006; Barroug *et al.* 2008; Autefage *et al.* 2009 a; Errassifi 2011]. L'une des études les plus citées est celle de Nancollas *et al.* [Nancollas *et al.* 2006] portant sur l'adsorption de diverses molécules de bisphosphonates sur l'HA stœchiométrique qui décrit les interactions BP-HA à l'aide du modèle de Langmuir quelle que soit la nature des BP étudiés. Ce modèle a ensuite été confirmé dans le cadre de la même interaction BP-HA [Errassifi 2011] pour une HA synthétisée selon un protocole légèrement différent quelles que soient les caractéristiques du support apatitique. Notons que des molécules d'intérêt biologique, autres que celles appartenant aux phosphonates, telles que les protéines : le sérum d'albumine bovine (BSA) [Kandori *et al.* 2005; Barroug *et al.* 2008], la phosphosérine [Benaziz *et al.* 2001], la catalase [Barroug *et al.* 1998 a] ou encore le lysozyme [Barroug *et al.* 1997; Kandori *et al.* 2005] suivent elles aussi une isotherme de type Langmuir lors de leur adsorption sur l'HA.

Dans le cas des apatites nanocristallines biomimétiques non stœchiométriques, bien que peu d'études ait été faites sur leur interaction avec les bisphosphonates, le modèle simple de Langmuir semble être le plus satisfaisant et approprié pour décrire l'adsorption de molécules d'intérêt biologique de façon générale [Errassifi 2011].

Référons nous maintenant à quelques chiffres et comparons les paramètres d'adsorption : K et N, respectivement la constante d'affinité et la quantité adsorbée à saturation, obtenus dans les travaux de Nancollas *et al.* [Nancollas *et al.* 2006] et de Errassifi *et al.* [Errassifi 2011] portant

sur l'adsorption de type Langmuir de molécules BP sur l'HA et/ou NCA avec ceux acquis dans notre étude (tableau 2-15).

Références	Adsorbat (bisphosphonates)	Adsorbant [méthode de synthèse]	K (L/mmol)	N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	δ (nm ²)
[Nancollas et al. 2006]	Clodronate Etidronate Risédronate Ibandronate Alendronate Zolédronate	Hydroxyapatite [Arends et al. 1979]	0,72 \pm 0,12 1,19 \pm 0,10 2,19 \pm 0,17 2,36 \pm 0,32 2,94 \pm 0,24 3,47 \pm 0,18		
[Errassifi 2011]	Risédronate	Hydroxyapatite [Trombe 1972] NCA carbonatée 1 jour 30 jours (NCA2)	7,3 \pm 3,6 2,7 \pm 1,0 2,4 \pm 1,0	2,3 \pm 0,1 5,9 \pm 1,2 3,1 \pm 0,7	0,70 0,30 0,50
Notre étude	Tiludronate	NCA non carbonatée 0 jour (NCA1) 30 jours (NCA3) NCA carbonatée 30 jours (NCA2)	18,48 \pm 0,86 4,44 \pm 0,97 10,13 \pm 1,27	2,710 \pm 0,006 1,69 \pm 0,03 2,17 \pm 0,02	0,61 0,98 0,77

Tableau 2-15: Tableau non exhaustif récapitulatif des paramètres d'adsorption de Langmuir : K et N et de la surface occupée par une molécule de bisphosphonates (δ) pour des composés phosphocalciques apatitiques de diverse nature à une température de 37°C et un pH de 7,4

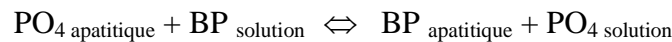
On peut observer une certaine disparité pour la valeur des constantes d'affinité, en fonction des caractéristiques de surface du composé phosphocalcique apatitique et de la nature des molécules adsorbées. L'effet du support est illustré par les résultats de Errassifi *et al.* et la présente étude. Si dans notre cas la maturation de l'apatite nanocristalline montre une nette diminution de la constante d'affinité, ces variations ne sont pas observées par Errassifi qui cependant utilise une apatite déjà maturée 24 heures et carbonatée. Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer l'origine de ces différences. La quantité absorbée à saturation (N) apparaît toujours supérieure pour les apatites nanocristallines les plus immatures. Ce phénomène peut être relié au développement de la couche hydratée entre les apatites maturées et non maturées ; par ailleurs, on peut observer que pour l'apatite carbonatée maturée dans laquelle cette couche est plus développée que dans le cas de l'apatite maturée sans carbonate le même phénomène est observé. La mobilité ionique dans cette couche permet probablement une plus grande densité et ainsi l'adsorption de molécules que sur une surface figée. Si on compare l'adsorption de molécules de risédronate et de tiludronate sur une apatite équivalente à NCA2, les valeurs différentes de K et N attestent de l'influence

de la nature du BP sur l'adsorption en accord avec les conclusions de l'étude de Nancollas *et al.* Notons que les molécules de tiludronate conduisent à une quantité adsorbée à saturation inférieure à celle du risédronate et l'encombrement moyen calculé de la molécule de tiludronate apparaît, logiquement, supérieur.

Si l'observation de la fixation d'une molécule sur un substrat apatitique avec libération d'ions phosphates a été décrite à plusieurs reprises [Josse *et al.* 2005; Roussière *et al.* 2005; Errassifi *et al.* 2009], il existe relativement peu d'études quantitatives sur ce processus et l'adsorption n'est pas la seule réaction susceptible de conduire à ce résultat. Une autre possibilité serait un mécanisme de déplacement ionique si un sel de calcium du bisphosphonate apparaît dans des conditions expérimentales données plus insoluble que l'apatite nanocristalline. Ce phénomène a été décrit par Josse *et al.* dans le cas de l'adsorption sur du β -TCP et il se traduit par une libération de phosphate. Toutefois dans ce cas la réaction ne conduit pas une isotherme de type Langmuir, et notamment l'addition continue de l'adsorbant amène une libération continue de phosphate, il n'y a donc pas de palier. Enfin dans un tel processus la quantité d'ions phosphate libérés dépend à la fois de la composition de l'apatite et du type de sel Ca-BP formé et peut être aisément calculée une fois les équations chimiques établies. Remarquons en outre qu'il n'est pas impossible d'avoir à la fois un phénomène d'adsorption et un phénomène de déplacement ionique. Dans notre cas, aucune formation de phase étrangère n'est détectée par diffraction des rayons X et des isothermes de type Langmuir ont été observés. La formation d'une phase amorphe semble par ailleurs exclue suite aux observations en microscopie électronique et par EDX.

L'étude menée par Errassifi *et al.* [Al-Kattan *et al.* 2010; Errassifi 2011] montre un processus d'échange BP en solution – PO_4 de surface avec un rapport très proche de « 1-1 » c'est-à-dire une molécule risédronate adsorbée pour une espèce phosphate libérée issu de composé NCA. Les travaux de Palazzo *et al.* portant sur l'adsorption de molécules d'alendronate sur des nanocristaux d'apatites de morphologie diverses (plaquettes et aiguilles) mettent en évidence un échange conduisant à la substitution de deux groupements phosphate par les deux groupements phosphonates d'une molécule d'alendronate soit un rapport de « 1-2 » [Palazzo *et al.* 2007]. Dans notre cas, les composés NCA1 et NCA2 présentent un rapport de « 1-1,23 » et « 1-1,26 » respectivement. Alors que le rapport obtenu pour NCA3 est nettement différent avec « 1-2,20 ». Ces rapports seront discutés par la suite.

Bien que le modèle de Langmuir semble le plus adapté, la considération d'équilibre chimique et donc de réversibilité qui définit ce modèle n'est pas respectée dans notre cas puisqu'une irréversibilité totale ou partielle de l'adsorption sur ces apatites vis-à-vis de la dilution, ou d'un simple lavage, a été observée. L'étude de la libération des BP en milieu aqueux a permis de le vérifier. Les résultats montrent une libération immédiate dès les premiers instants quels que soient les supports et un équilibre atteint au bout de seulement quelques heures en accord avec les observations de Palazzo *et al.* lors de la libération de molécules d'alendronate sur des apatites nanocristallines [Palazzo *et al.* 2007]. La libération de tiludronate dans l'eau ultrapure de l'ordre du $\mu\text{mol/L}$ a pu être détectée toutefois cette libération est faible, seulement quelques pourcents du BP adsorbé sur les supports sont libérés au cours des premiers jours. Ces constatations ont déjà été notées par Fauchaux *et al.* lors de la libération de zolédronate préalablement chargé sur des apatites déficientes en calcium [Fauchaux *et al.* 2009]. Cette irréversibilité d'adsorption sur ces apatites nanocristallines biomimétiques a aussi fait l'objet d'observations dans le cas de macromolécules telles que l'albumine de sérum bovin (BSA) [Barroug *et al.* 2008], l'héparine [Menbaoui *et al.* 2004] ou encore les facteurs de croissance : rhBMP2 [Autefage *et al.* 2009]. La formation de liaisons multiples, ou encore un changement de configuration ou de propriétés de surface [Errassifi *et al.* 2010] ont été examinés. Pourtant aucune de ces interprétations ne semble convenir à notre cas puisque le bisphosphonate est une molécule simple. Notons également que le processus d'adsorption décrit par Langmuir (équation 1) ne tient compte que de la concentration en solution de la molécule et ne décrit pas la totalité du processus qui implique un déplacement d'ions phosphate. Errassifi *et al.* [Errassifi *et al.* 2010] proposent d'écrire la réaction d'adsorption sous forme d'un échange ionique de surface :

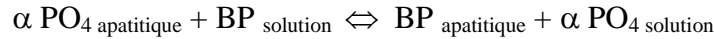


Ainsi, la définition de la constante d'équilibre de la réaction (K) a été révisée (K_{ex}) (13) et une équation corrigée de l'équation d'isotherme d'adsorption de Langmuir a été établie (14) basée sur l'équation d'échange ionique ci-dessus.

$$K_{ex} = P_{sol} \times \frac{Q_{ads}}{C_{eq} \times (N - Q_{ads})} \quad (13) \qquad Q_{ads} = N \times \frac{\left(K_{ex} \times \frac{C_{eq}}{P_{sol}} \right)}{1 + \left(K_{ex} \times \frac{C_{eq}}{P_{sol}} \right)} \quad (14)$$

- Avec: - K_{ex} : constante d'équilibre de la réaction d'échange,
- P_{sol} (mmol/L): concentration de phosphate en solution,
- C_{eq} (mmol/L): concentration d'adsorbat en solution à l'équilibre,
- Q_{ads} ($\mu\text{mol/m}^2$): quantité d'adsorbat fixée par unité de surface d'adsorbant,
- N ($\mu\text{mol/m}^2$): le nombre maximum de sites d'adsorption occupés par unité de surface.

Toutefois, bien que le processus d'échange de substitution identifié soit le même que dans l'étude de Errassifi *et al.*, dans notre cas, les rapports de substitution sont, pour nous assez différents « 1-1,23 », « 1-1,26 » et « 1-2,20 » et non de « 1-1 ». Par conséquent, nous devons tenir compte du rapport: « molécule tiludronate adsorbée - espèce phosphate libérée », notées : « 1- α » dans notre équation.



L'équation (15) que nous proposons pour décrire notre cas est :

$$K_e = \frac{[\text{BP}_{\text{apat}}] \times [\text{P}_{\text{sol}}]^\alpha}{[\text{P}_{\text{apat}}]^\alpha \times [\text{BP}_{\text{sol}}]} = \frac{Q_{\text{ads}} \times P_{\text{sol}}^\alpha}{[\alpha(N - Q_{\text{ads}})]^\alpha \times C_{\text{eq}}} \quad (15) \quad \text{Avec : } [\text{P}_{\text{apat}}] = \alpha \times (N - Q_{\text{ads}})$$

Avec: - K_e : constante d'équilibre de la réaction d'échange dans notre cas,
 - C_{eq} (mmol/L): concentration d'adsorbat en solution à l'équilibre,
 - Q_{ads} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$): quantité d'adsorbat fixée par unité de surface d'adsorbant,
 - N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$): quantité adsorbée à saturation soit le nombre maximum de site d'adsorption occupé par unité de surface,
 - P_{sol} (mmol/L) : concentration en phosphate dans la solution,
 - α : facteur de proportion « espèce phosphate libérée » pour une molécule de tiludronate adsorbée, avec $\alpha_{\text{NCA1}}=1,23$, $\alpha_{\text{NCA2}}=1,26$ et $\alpha_{\text{NCA3}}=2,20$

$$\text{soit: } Q_{\text{ads}}^{\frac{1}{\alpha}} = K_e^{\frac{1}{\alpha}} \times \alpha \times (N - Q_{\text{ads}}) \times \left(\frac{C_{\text{eq}}^{\frac{1}{\alpha}}}{P_{\text{sol}}} \right) \quad (16)$$

La constante d'équilibre ionique et la quantité adsorbée à saturation respectivement K_e et N sont ainsi déterminées à partir de la linéarisation suivante :

$$\frac{Q_{\text{ads}}^{\frac{1}{\alpha}} \times P_{\text{sol}}^{\frac{1}{\alpha}}}{C_{\text{eq}}^{\frac{1}{\alpha}}} = K_e^{\frac{1}{\alpha}} \times \alpha \times N - K_e^{\frac{1}{\alpha}} \times \alpha \times Q_{\text{ads}} \quad (17)$$

$$\frac{Q_{\text{ads}}^{\frac{1}{\alpha}} \times P_{\text{sol}}^{\frac{1}{\alpha}}}{C_{\text{eq}}^{\frac{1}{\alpha}}} = f(Q_{\text{ads}}) \quad \text{Avec: } \text{pente} = -\alpha \times K_e^{\frac{1}{\alpha}}$$

$$\text{ordonnée} \cdot \text{à} \cdot \text{l'origine} = K_e^{\frac{1}{\alpha}} \times N \times \alpha$$

La figure 2-53 présente les linéarisations de l'isotherme corrigée des trois composés : NCA1, NCA2 et NCA3. Dans cette détermination nous avons utilisé la concentration totale en ions phosphates, puisqu'il est difficile de déterminer le type d'ion « phosphate » mis en jeu (PO_4^{3-} ou HPO_4^{2-}).

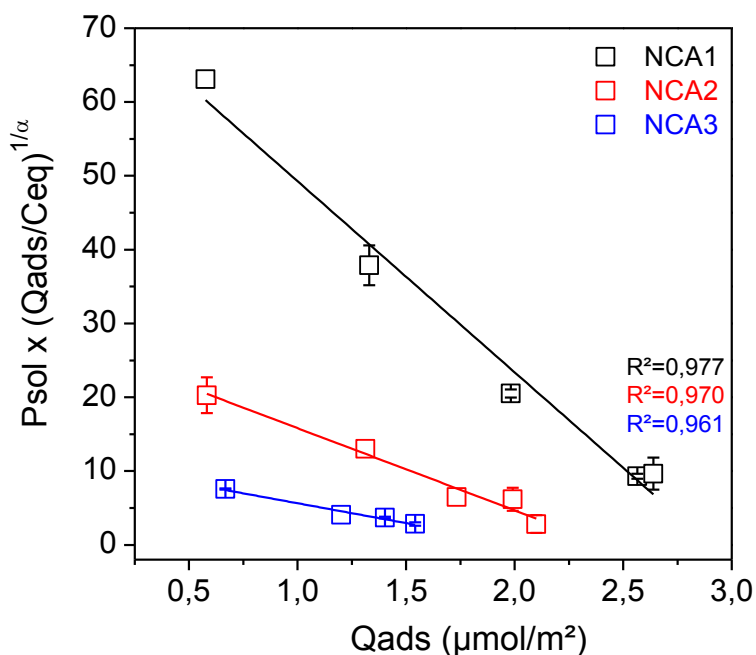


Figure 2-53:
Linéarisations de l'isotherme corrigé des trois composés : NCA1, NCA2 et NCA3 selon l'équation établie dans notre cas

Les paramètres d'adsorption : K_e et N obtenus sont les suivants :

Noms	Carbonatation - Maturation	Echange ionique		Langmuir	
		N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	K_e	N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	K (L/mmol)
NCA1	non carbonatée - 0 jour	$2,90 \pm 0,05$	$42,4 \pm 0,08$	$2,710 \pm 0,006$	$18,48 \pm 0,86$
NCA2	carbonatée - 31 jours	$2,42 \pm 0,06$	$15,6 \pm 0,09$	$2,17 \pm 0,02$	$10,13 \pm 1,27$
NCA3	non carbonatée - 31 jours	$2,05 \pm 0,07$	$7,15 \pm 0,12$	$1,69 \pm 0,03$	$4,44 \pm 0,97$

Tableau 2-16: Tableau récapitulatif des paramètres d'adsorption : K et N pour les trois composés NCA1, NCA2 et NCA3 selon la linéarisation de Langmuir et de l'échange ionique établi dans notre cas

Les valeurs de la quantité adsorbée à saturation, N , obtenues en considérant l'équilibre ionique sont légèrement supérieures à celles obtenues sur l'isotherme de Langmuir bien qu'elles restent du même ordre (tableau 2-16). Bien que la constante d'équilibre ionique K_e ait une signification différente de celle de la constante d'affinité K et inclut notamment le rôle joué par les ions phosphate dans la réaction d'adsorption, on observe la même évolution : $NCA1 > NCA2 > NCA3$.

Maintenant que la nature de l'interaction entre les molécules de BP et les supports apatitiques biomimétiques a été clarifiée, une modélisation de cette interaction reste à établir.

Diverses modélisations de l'interaction entre des molécules de bisphosphonates et l'os humain ont été établies par Mukherjee *et al.* sur des bases thermodynamiques [Mukherjee *et al.* 2009] puis spectroscopiques, par RMN du solide [Mukherjee *et al.* 2008].

▪ *L'étude thermodynamique* de l'interaction BP-os humain menée par Mukherjee *et al.* propose deux modèles d'interactions possibles schématisés en figure 2-54.

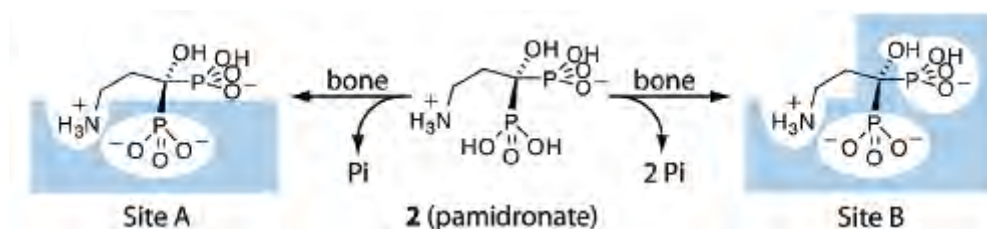


Figure 2-54: Schématisation des deux modèles de fixation du pamidronate sur l'os humain en site A « liaisons faibles » et en site B « liaisons fortes » selon Mukherjee *et al.* [Mukherjee *et al.* 2009]

Le premier modèle schématisé à gauche sur la figure 2-54 et nommé par l'auteur « site A » correspond à un mode de fixation d'une molécule de bisphosphonate, le pamidronate dans l'exemple, accompagnée d'un déplacement d'un phosphate alors que le deuxième modèle, schématisé à droite et appelé « site B », correspond à un mode de substitution de deux phosphate pour une molécule de bisphosphonate fixée. Ainsi, selon Mukherjee *et al.*, l'interaction BP-os peut être expliquée par deux types d'échanges ioniques conduisant à un ou deux ions phosphate libérés par molécule de bisphosphonate. D'après cet auteur le mode d'adsorption dépend essentiellement de la nature du bisphosphonate et de l'enthalpie libre d'adsorption (ΔG). Les faibles enthalpies (-4,7 et -6,5 kcal/mol) correspondent au site A (*weak binding site*) et les fortes enthalpies (-7,3 et -10,4 kcal/mol) au site B (*strong binding site*). Dans notre cas, le tiludronate s'apparenterait plutôt aux BPs s'adsorbant préférentiellement en site A d'après Mukherjee *et al.*, toutefois dans notre étude les résultats expérimentaux montrent deux types d'adsorption du tiludronate suivant le support considéré : NCA1 et NCA2 pour lesquels 1,2-1,3 ions phosphate sont libérés par molécule de BP adsorbée s'apparentent au cas « site A » et NCA3 pour lequel 2,2 ions phosphate sont libérés se rapproche du cas « site B ». Néanmoins, aucun détail n'est mentionné sur la façon dont ce type de substitution a lieu dans cette première publication.

▪ *L'étude spectroscopique menée par RMN du solide* sur l'interaction de différents BPs avec l'os humain [Mukherjee *et al.* 2008] propose un modèle moléculaire de liaison BP-minéral osseux, avec le pamidronate (figure 2-56) pour expliquer comment les phosphates se lient au minéral osseux lorsqu'un processus de chimisorption de type Langmuir mettant en jeu un échange ionique phosphate-phosphonate dans une proportion « 1-1 » a été préalablement défini. Ce modèle s'appuie sur la structure cristalline de l'hydroxyapatite,

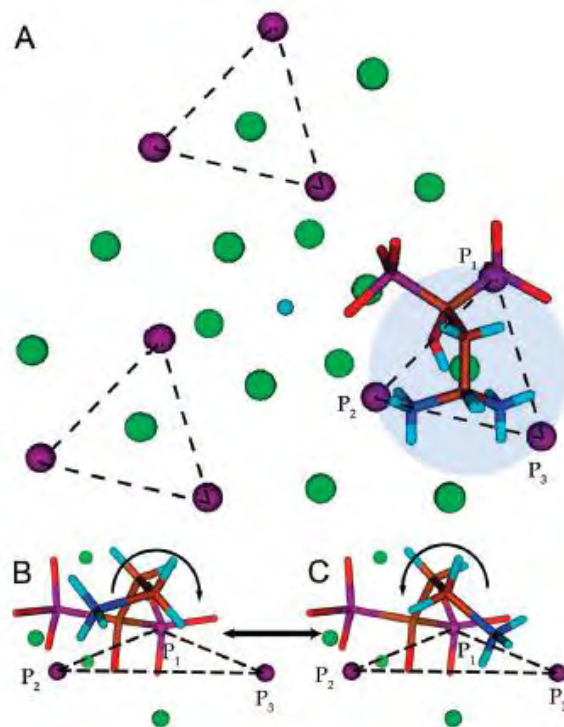
comme modèle de l'os, caractérisée par des arrangements de tétraèdres de phosphate et propose le modèle suivant illustré en figure 2-55 :

- un des deux phosphonates issu du BP déplace un phosphate du minéral osseux (P_1) (figure 2-55 A)
- le groupement terminal NH_3^+ peut interagir électrostatiquement avec un des deux phosphate restants (P_2/P_3) du triangle des P (figure 2-55 B et C)
- le groupement hydroxyle du BP interagit avec le calcium situé dessous

Figure 2-55:
Modèles moléculaires de l'interaction
pamidronate-minéral osseux selon Mukherjee *et al.*
 [Mukherjee *et al.* 2008]
 Carbone en marron, Oxygène en rouge, Hydrogène en
 bleu, Phosphore en violet, Calcium en vert et NH_3^+ en
 bleu foncé



Figure 2-56: Structure moléculaire du
 pamidronate [Mukherjee *et al.* 2008]



Mukherjee *et al.* montrent qu'une interaction forte des différents BPs étudiés avec le calcium du minéral osseux existe, accompagnée d'un déplacement des PO_4^{3-} . De plus, ils précisent dans leur étude que les chaînes latérales présentent une mobilité restreinte et l'état de protonation peut être directement observé grâce à cette technique d'analyse. Remarquons que ce modèle considère seulement l'adsorption sur le plan (001) de l'apatite qui n'est pas la face dominante d'un cristal d'apatite osseuse, qui correspondrait plutôt à des plans cristallographiques de type (100). Par ailleurs, aucune modélisation n'est proposée lorsqu'une molécule de BP déplace deux ions phosphate.

D'un point de vue cristallographique, le simple mécanisme de substitution proposé par Mukherjee *et al.* pour l'adsorption de type A ne peut être appliqué dans le cas du type B. En effet, lorsqu'on considère la structure cristalline de l'hydroxyapatite (plan 100) à l'aide du logiciel *Crystalmaker/2.1.5*, *Crystalmaker Software Ltd.* [Pritzkow *et al.* 1985] (figure 2-58 A

et B), on peut observer que la distance qui sépare deux mêmes phosphores de maille adjacente est de l'ordre de 6,9 Å (figure 2-58 B) et la distance minimale entre deux phosphore est l'ordre de 4,1 Å (figure 2-58 B) alors que la distance maximale qui sépare les deux phosphores d'un BP, pour le tiludronate notamment, est de 3,9 Å en considérant un angle PCP égal 180°, la distance optimale s'établissant à 3,3 Å en utilisant la modélisation *Chem3DPro/11.0, CambridgeSoft* (figure 2-57). Il paraît difficile dans ces conditions d'incorporer du BP en substituant deux groupements PO_4^{3-} voisins d'une face 100.

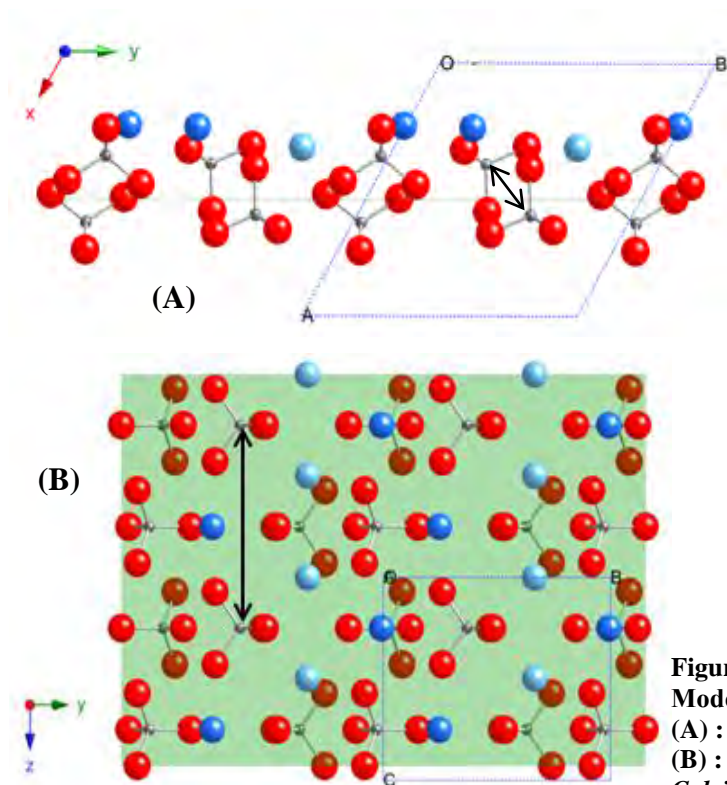


Figure 2-58:
Modélisation de la structure de l'HA
 (A) : projection dans le plan (001)
 (B) : projection dans le plan (100)
 Calcium en bleu (Ca_I) et bleu foncé (Ca_{II}), Oxygène en rouge et Phosphore en gris



Figure 2-57 :
Modélisation de la molécule de tiludronate
 Carbone en noir, Oxygène en rouge, Phosphore en gris, Hydrogène en blanc, Chlore en vert et Soufre en jaune

Le modèle de l'hydroxyapatite stœchiométrique semble cependant peu adapté à notre cas et au cas du minéral osseux, pour lesquels la couche de surface hydratée, contenant des environnements dits « non-apatitiques » des ions minéraux, est certainement différente du modèle cristallographique choisi. La principale difficulté est qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune détermination structurale de cette couche hydratée. On peut cependant considérer d'après les résultats des spectroscopies IR, que cette couche pourrait être proche de la couche hydratée du phosphate octocalcique (OCP) comme l'avait proposé Brown dans son modèle de surface d'une apatite [Brown *et al.* 1984]. L'OCP, de structure triclinique, de formule $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ est caractérisé par une structure lamellaire formée d'une succession de couches dites « apatitiques » et « hydratées » (figure 2-59). La couche apatitique contient des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} avec des positions proches de celles d'une apatite stœchiométrique

alors que la couche hydratée comprend des ions Ca^{2+} et HPO_4^{2-} . Brown [Brown *et al.* 1984] utilise la structure particulière de l'OCP pour proposer un modèle de couche hydratée à la surface de l'apatite comme schématisé en figure 2-59.

En faisant l'hypothèse de ce modèle, la distance qui sépare deux phosphores d'un même plan de « surface » (plan (100)) pris dans la couche hydratée de l'OCP et la distance minimale entre deux phosphores sont du même ordre de grandeur que celui de l'HA soit respectivement est égale à 6,87 Å (figure 2-61) et 4,1 Å (figure 2-60). Par conséquent, le modèle de double « substitution » proposé par Mukherjee *et al.* lors d'un échange ionique de proportion « 1-2 » (cas pour l'adsorption sur NCA3) pour lequel deux groupements phosphonates déplaceraient deux ions phosphate de la couche de surface semble peu envisageable.

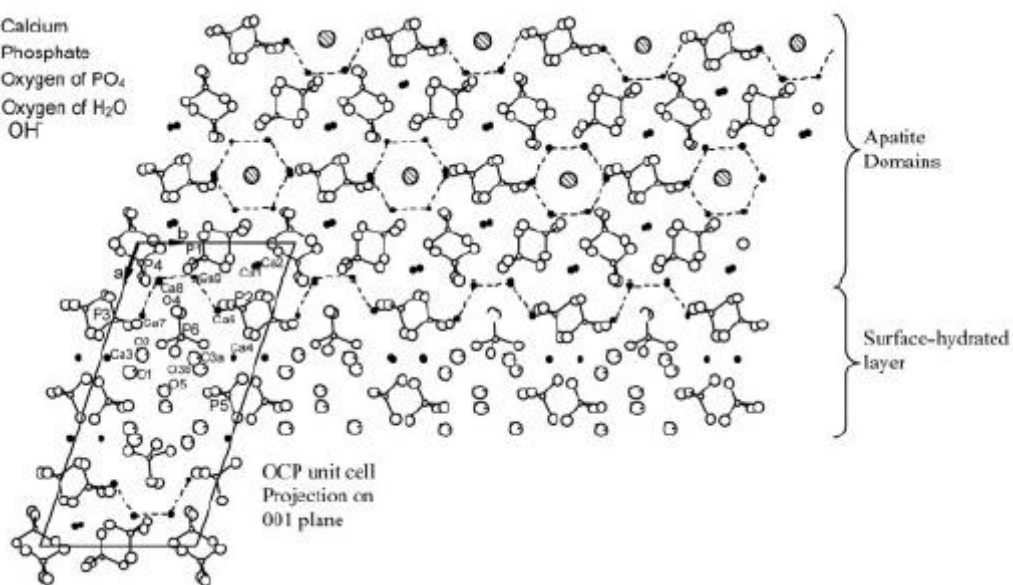


Figure 2-59: Modèle de Brown [Brown *et al.* 1984] basé sur la structure de l'OCP (projection dans le plan (001))

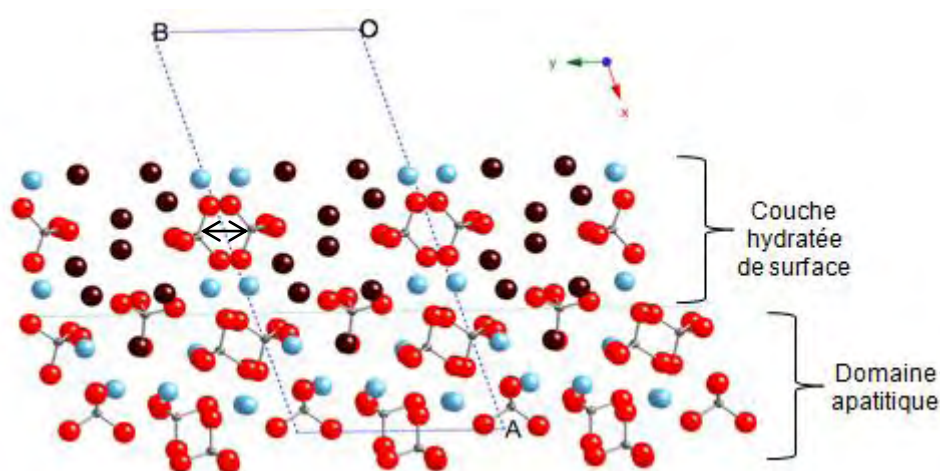


Figure 2-60: Modélisation de la structure de l'OCP (projection dans le plan (001))
- Calcium en bleu, Oxygène en rouge et en marron (OH), Phosphore en gris -

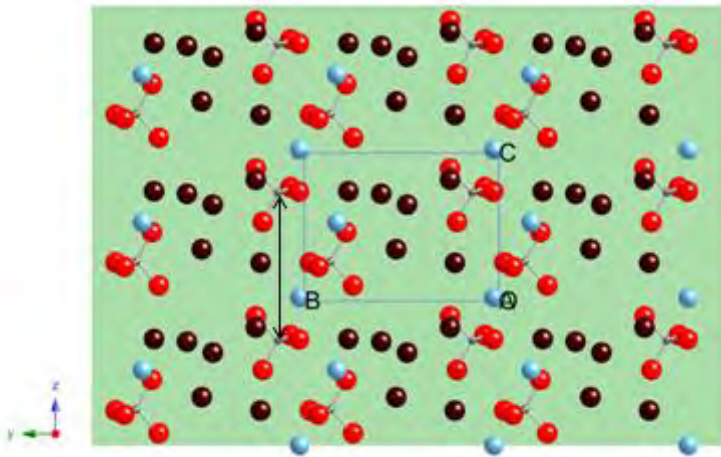


Figure 2-61 :
Modélisation de la structure de
l'OCP, projection dans le plan (100)
- Calcium en bleu, Oxygène en rouge
et en marron (OH) et Phosphore en
gris -

Dans la littérature, l'autre interprétation de l'interaction de bisphosphonates en surface de l'hydroxyapatite suggère une interaction entre le bisphosphonate et les atomes de calcium de l'hydroxyapatite. L'étude menée par Boanini *et al.* [Boanini *et al.* 2007] porte sur des nanocristaux composites HA-alendronate synthétisés par ajout d'alendronate lors de la synthèse de l'hydroxyapatite. Une coordination possible des molécules d'alendronate à la surface de l'hydroxyapatite, présentée en figure 2-62, est proposée par les auteurs. Elle montre une distance similaire entre les phosphate de la structure de Ca-alendronate et la longueur de l'axe c de la structure de l'hydroxyapatite suggérant une interaction entre molécule d'alendronate et atomes de calcium issus de l'hydroxyapatite. Fernandez *et al.* [Fernandez *et al.* 2003] au cours de leur étude d'un composé calcium-alendronate suggère aussi une interaction entre le cation bivalent (Ca) et les atomes d'oxygène déprotoné issu de molécule de bisphosphonate.

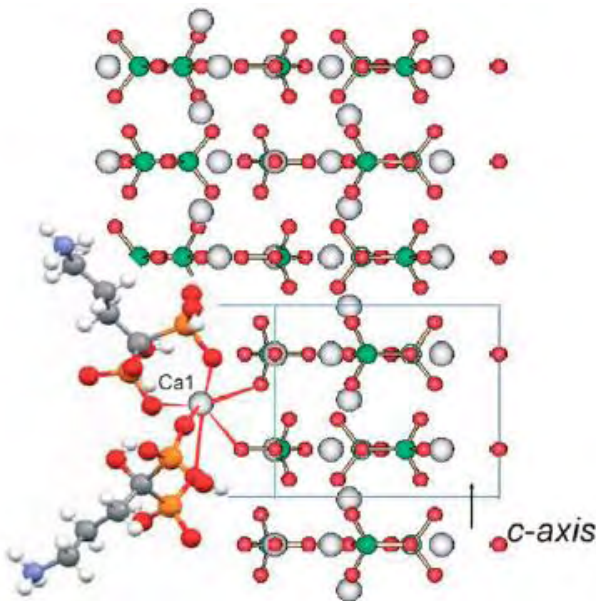


Figure 2-62:
Coordination proposée par Boanini et al.
[Boanini *et al.* 2007] de molécules d'alendronate
en surface de l'hydroxyapatite.
Structure de Ca-alendronate sur le plan (101) aligné
le long de l'axe c de la structure de l'hydroxyapatite.
-Calcium en blanc, Oxygène en rouge, Phosphate de
l'HA en vert et Phosphate de l'alendronate en orange-

Les travaux menés par Ong *et al.* [Ong *et al.* 2008] sur l'interaction entre le clodronate et des nanoparticules d'hydroxyapatite par phénomène d'adsorption propose lui aussi un mécanisme d'accroche du bisphosphonate sur l'hydroxyapatite entre les oxygènes de la molécule active et le calcium (figure 2-63). L'incorporation d'alendronate sur des microsphères de phosphate de calcium via un processus d'émulsion réalisé par Kim *et al.* [Kim *et al.* 2010] considère aussi une association molécule active microsphère via une liaison $O_{\text{alendronate}}-\text{Ca}_{\text{microsphère}}$ comme illustré en figure 2-63.

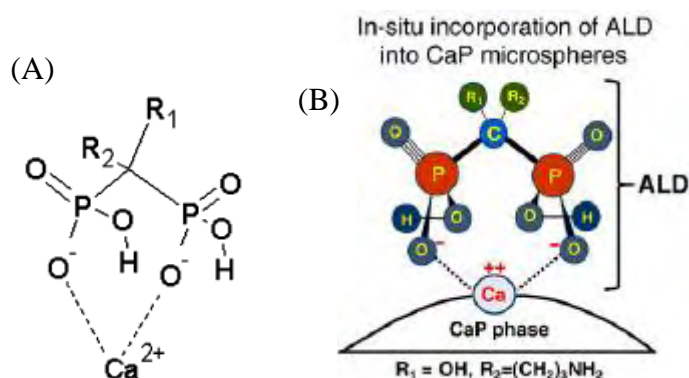


Figure 2-63

(A) Mécanisme d'accroche du clodronate sur l'hydroxyapatite selon Ong *et al.* [Ong *et al.* 2008]

(B) Mécanisme d'incorporation d'alendronate sur des microsphères de phosphate de calcium via un processus d'émulsion selon Kim *et al.* [Kim *et al.* 2010]

L'interprétation possible que nous suggérons dans notre cas, serait donc une adsorption en deux étapes avec fixation des groupements phosphonates sur les ions calcium de la surface associée à une déprotonation de la molécule et à une restructuration de la surface combinée à l'élimination d'ions phosphate ayant capté ces protons. La modélisation *Chem3DPro/11.0, CambridgeSoft* suggère une interaction d'une molécule de tiludronate avec deux calcium de la surface de l'OCP (ou de l'HA). La figure 2-65 illustre les modélisations de la fixation de molécules de tiludronate sur ces structures (figure 2-65, 1 et 2). Notons que la modélisation utilisée semble montrer que les atomes d'oxygènes ne vont pas préférentiellement se positionner exactement au dessus des atomes de calcium mais se positionnent en léger décalage, probablement pour des raisons d'encombrement stérique. Ces modèles mériteraient cependant d'être confirmés en utilisant des logiciels spécifiques à l'adsorption de molécules.

Les deux étapes envisagées dans ce mécanisme sont illustrées en figure 2-64 et définies ainsi :

1. La molécule de bisphosphonate, le tiludronate dans notre cas, se fixe en surface du minéral osseux via deux sites du calcium. Cette fixation est accompagnée d'une déprotonation totale ou partielle de la molécule de tiludronate

2. Le ou les deux protons libérés se fixent sur les HPO_4^{2-} de la couche hydratée, présentant une interaction moindre avec le calcium, pour donner des ions H_2PO_4^- qui passent en solution. Une restructuration de la surface semble inévitable pour s'adapter à ces différentes perturbations.

Ce mécanisme supposé implique que l'adsorption et la libération de phosphate sont deux évènements connexes mais que la réaction primaire ne correspond pas réellement à un échange BP-phosphate. Dans ces conditions, il n'est pas surprenant qu'on puisse observer des libérations d'ions phosphate variables selon la nature du BP mais aussi du substrat considéré et des restructurations de surface nécessaires. En l'occurrence, c'est l'apatite qui présente l'affinité la plus faible et le plus petit nombre de sites d'adsorption à saturation qui libère le plus d'ions phosphate pour une molécule de BP fixée. Il paraît cependant difficile d'expliquer à l'heure actuelle les raisons de cette différence de comportement entre les différentes apatites nanocristallines. On peut se demander si cette réaction en plusieurs étapes ne remet pas en cause les équilibres chimiques proposés. En fait, l'équation établie (p.116) représente la globalité du phénomène et ne prétend pas détailler les différentes étapes du mécanisme d'adsorption. Elle reste donc parfaitement valide.

Le comportement particulier de l'apatite NCA3 (déplacement de 2,2 phosphates pour une molécule de tiludronate) paraît assez difficile à interpréter. Remarquons toutefois que cette apatite est celle qui a la couche hydratée la moins développée et qui se rapproche le plus d'une hydroxyapatite stœchiométrique. Elle montre en particulier une morphologie cristalline de type aciculaire. Il serait probablement intéressant d'utiliser des modèles de chimie théorique pour essayer de préciser les mécanismes d'adsorption sur ces différents substrats.

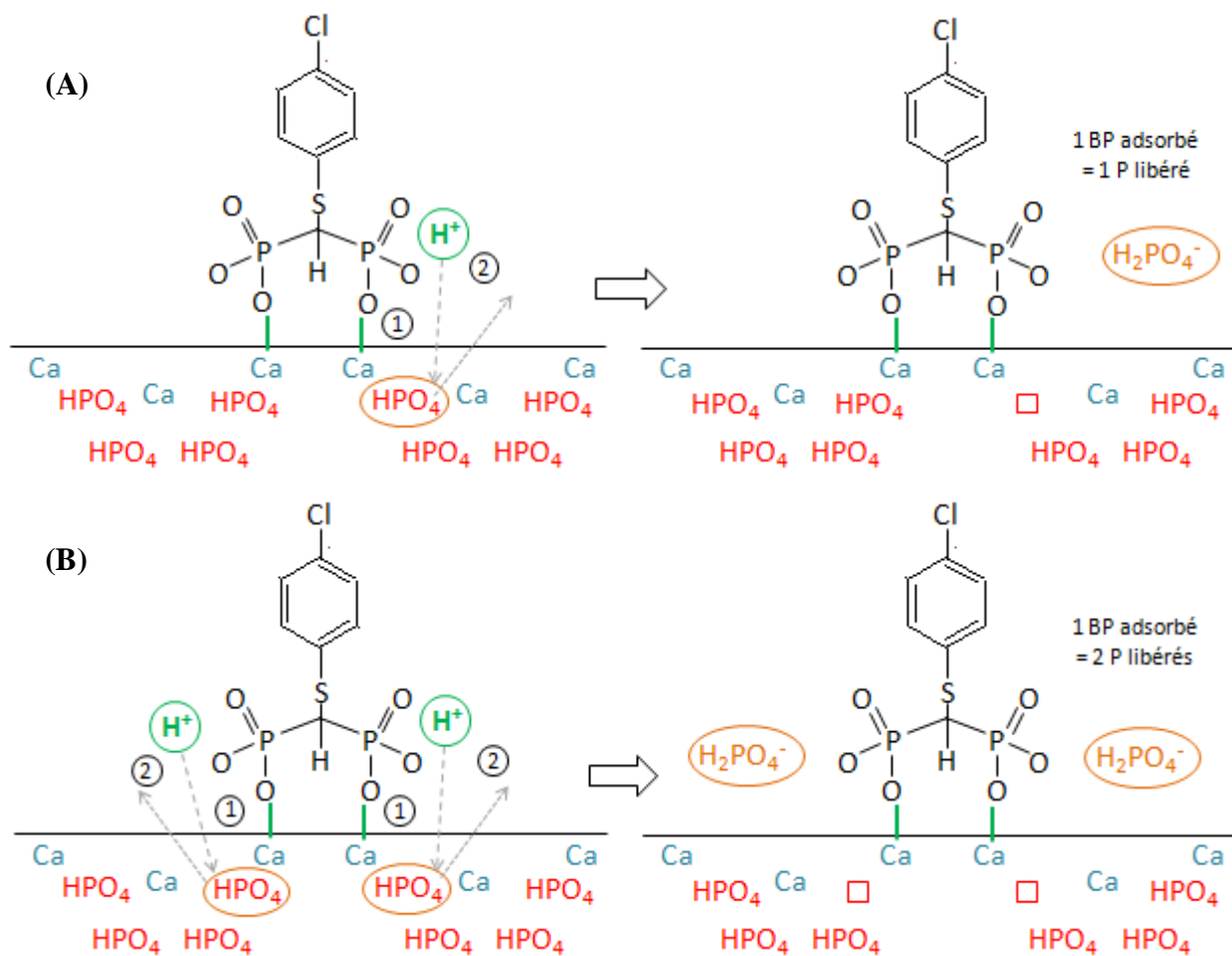


Figure 2-64: Schématisation du mécanisme proposé lors de l'adsorption de molécules de tiludronate sur les composés NCA1 et NCA2 (A) et NCA3 (B)

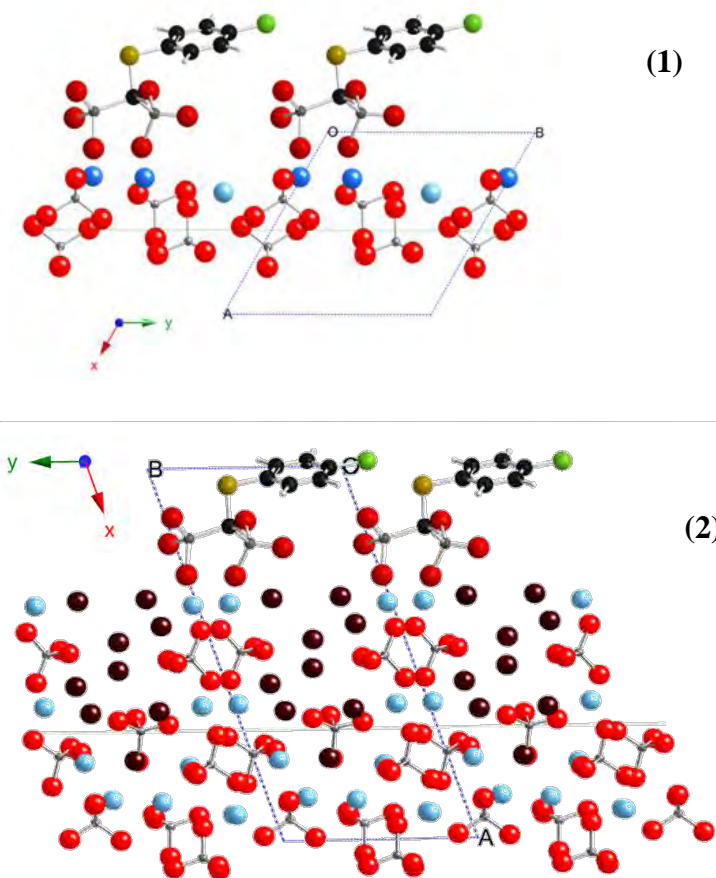


Figure 2-65: Modélisation de la fixation de molécules de tiludronate sur les structures de l'HAp (1) et de l'OCP (2) (projection dans le plan (001))
- Calcium en bleu, Oxygène en rouge et en marron (OH), Hydrogène en blanc, Phosphore en gris, Soufre en jaune, Carbone en noir et Chlore en vert -

Cette étude montre l'importance de la caractérisation des NCA afin d'évaluer le rôle du vieillissement et l'influence des carbonates en vue d'une meilleure compréhension de l'adsorption et de la libération de molécules actives telles que les bisphosphonates en surface du minéral osseux. Les apatites nanocristallines biomimétiques restent le sinon l'un des composés phosphocalciques apatitiques les plus proches du minéral osseux grâce à la présence de la couche hydratée de surface et aux propriétés particulières conférées par cette couche labile. Ces résultats ont démontré qu'elles constituent des modèles adaptés pour l'étude des interactions minéral osseux/cellules osseuses qui fera l'objet du prochain chapitre.

Chapitre 3

Etude du comportement cellulaire des apatites biomimétiques

Après un paragraphe récapitulatif succinct concernant les origines et les fonctions des cellules osseuses que sont les ostéoblastes et les ostéoclastes, ainsi qu'un état de l'art sur les interactions entre phosphates de calcium, bisphosphonates et cellules osseuses, nous nous intéresserons dans un deuxième temps à l'élaboration et à la caractérisation physico-chimique des supports apatitiques que nous utiliserons pour étudier le comportement cellulaire des apatites biomimétiques. Ces supports, sous forme de pastilles, seront élaborés à partir des poudres d'apatites nanocristallines NCA synthétisées et caractérisées dans le chapitre précédent, préalablement adsorbées ou non de tiludronate. Notons que seuls les composés NCA1 et NCA2 représentant respectivement le minéral osseux « jeune » et « mature », feront l'objet d'études dans ce chapitre.

Nous nous attacherons également à caractériser les pastilles avant leur mise en culture par une caractérisation physico-chimique et une caractérisation de la surface. De plus nous chercherons à appréhender le comportement de nos matériaux au contact d'un milieu de culture biologique exempt de cellules via une mesure de la cinétique de mouillabilité.

Dans un troisième temps, nous réaliserons des études préliminaires aux tests in vitro, toujours dans un milieu biologique exempt de cellule afin d'évaluer les variations de pH et de concentrations en ions minéraux de la solution lors de l'immersion des pastilles. Ces déterminations seront effectuées avec des conditions opératoires proches de celles qui seront utilisées pour les cultures cellulaires.

Enfin, nous réaliserons les tests in vitro afin d'étudier l'interaction entre nos matériaux associés ou non à des BPs et des cellules souches mésenchymateuses et/ou des cellules ostéoprogénitrices humaines: (HBMSC et HOP) puis avec des cellules ostéoclastiques d'origine murine. Les réponses cellulaires seront étudiées et les supports seront caractérisés tout au long des tests cellulaires afin de connaître leur évolution physico-chimique dans un milieu cellulaire.

A. Introduction bibliographique

I. Cellules osseuses

I. 1. Ostéoblastes

I. 1. 1. L'origine et la fonction des ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules mononuclées, avec une taille de l'ordre de la dizaine de μm , dérivant d'une cellule souche mésenchymateuse pluripotente. Les ostéoblastes synthétisent la matrice organique de l'os, l'ostéoïde, et contrôlent sa minéralisation. La faculté de cellules, isolées de la moelle osseuse, à former l'os *in vivo* fut prouvée par Friedenstein en 1988. L'ostéoformation est contrôlée par de nombreuses cytokines, des facteurs de croissance, des hormones dont les plus importantes sont : l'hormone parathyroïdienne (ou parathormone : PTH), les hormones sexuelles, les œstrogènes, les glucocorticoïdes et la vitamine D [Marie 2008].

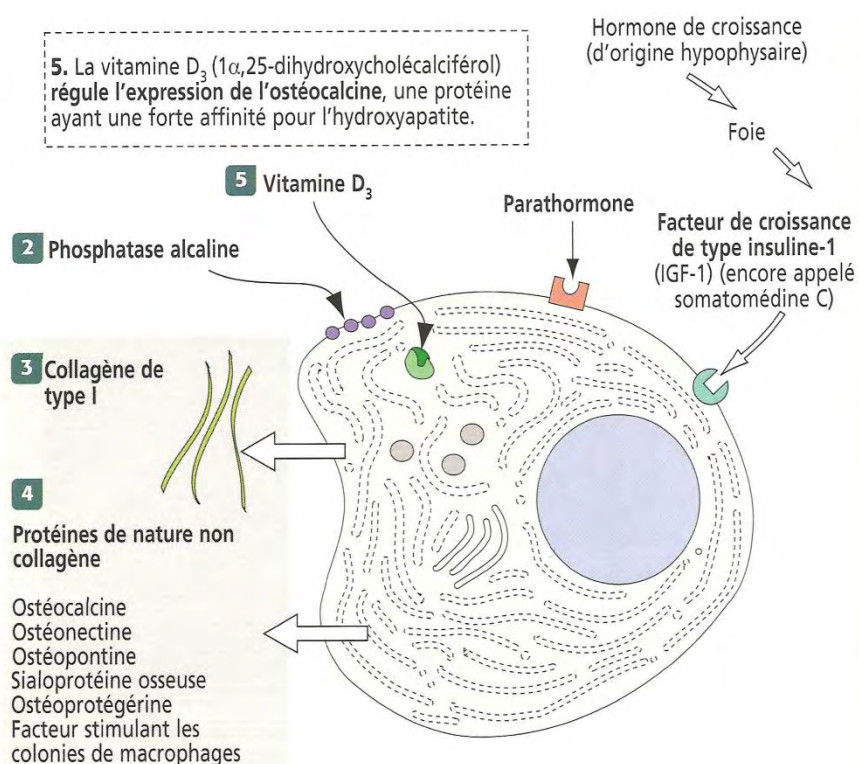


Figure 3-1 : Schéma descriptif du fonctionnement biologique d'un ostéoblaste [Kierszenbaum 2006]

Les principales protéines synthétisées par les ostéoblastes (figure 3-1) sont le collagène de type I et les protéines non collagéniques telles que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, l'ostéonectine, l'ostéoprotégérine (figure 3-2). L'*ostéocalcine* (Oc), régulée par la vitamine D₃, est la protéine non collagénique la plus abondante de l'os, présentant une forte affinité pour la surface apatitique et donc indispensable à la minéralisation osseuse. Elle donne

le signal pour le recrutement et la différenciation des ostéoclastes (figure 3-2). L'*ostéopontine* est une protéine d'adhésion cellulaire qui intervient dans l'attachement des ostéoclastes à la matrice osseuse en contrôlant la zone de scellement (régulation de la résorption osseuse). L'action de l'*ostéonectine* intervient au niveau du couplage formation-résorption osseuse. La *sialoprotéine osseuse* (*Bone sialoproteine*), quant à elle, régule la fixation des ostéoblastes à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de récepteurs membranaires impliqués dans la relation cellules / matrice, les intégrines [Mazières 2002; Kierszenbaum 2006].

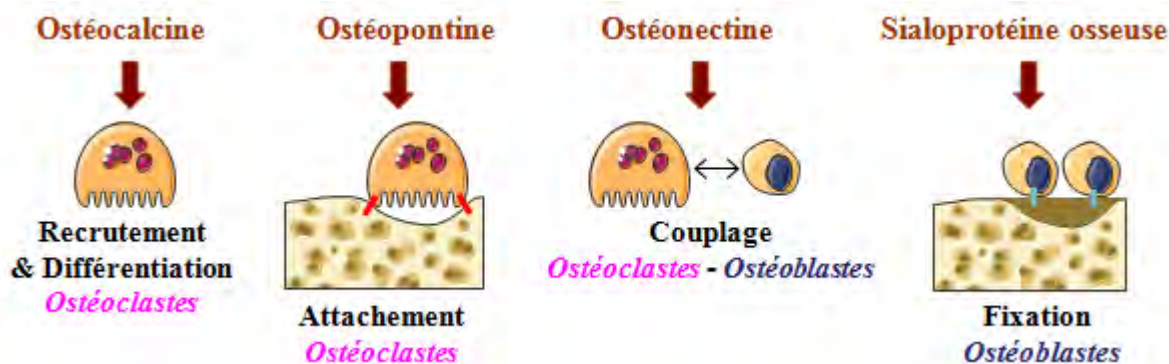


Figure 3-2 : Représentation schématique des mécanismes d'action des protéines non-collagéniques

Les ostéoblastes sont le lieu d'une réaction cytochimique forte régie par la phosphatase alcaline (ALP), protéine de la surface cellulaire (figure 3-1), qui hydrolyse les esters de monophosphate à pH élevé. Cette enzyme disparaît lorsque la cellule stoppe sa synthèse de protéines pour devenir un ostéocyte.

I. 1. 2. La différenciation des ostéoblastes

La différenciation ostéoblastique est contrôlée par des facteurs de croissance appartenant à la famille des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) notamment. La régulation du progéniteur ostéoblastique est également gouvernée par des facteurs de transcription, comme le facteur: *Cbfa1* (*core binding factor*)/ *Runx2*, qui induit la différenciation des cellules mésenchymateuses et contrôle l'expression des marqueurs spécifiques de l'ostéoblaste comme l'ostéocalcine (Oc), protéine sécrétoire spécifique exprimée uniquement par les ostéoblastes complètement différenciés. L'expression du facteur Cbfa1/runx2 est induite par les BMPs dont la BMP7. Ainsi, les souris déficientes en Cbfa1 ne seront composées, au terme de leur développement osseux, que de cartilage. Le deuxième facteur de transcription qui contrôle également la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques est le facteur osterix qui agit en aval du facteur Cbfa1/runx2.

I. 2. Ostéoclastes

I. 2. 1. L'origine et la différenciation des ostéoclastes

Les monocytes, précurseurs des ostéoclastes (OC), d'origine hématopoïétique, atteignent le tissu osseux grâce à la circulation du sang et fusionnent en cellules multinucléées, pouvant atteindre jusqu'à 30 noyaux, pour former les ostéoclastes [Kierszenbaum 2006]. Les ostéoclastes sont les seules cellules de l'organisme capables de résorber les tissus minéralisés [Anginot *et al.* 2008].

La différenciation des ostéoclastes est régulée par l'activité des ostéoblastes (figure 3-3). En effet, les ostéoblastes vont générer : le facteur M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*) responsable de la différenciation des OC et la cytokine RANK-L (*receptor activator of nuclear factor κ B ligand*) responsable de la maturation des OC, stade ultime de la différenciation au cours duquel la fusion des précurseurs mononucléés conduit à la formation de cellules géantes multinucléées résorbantes [Anginot *et al.* 2008].

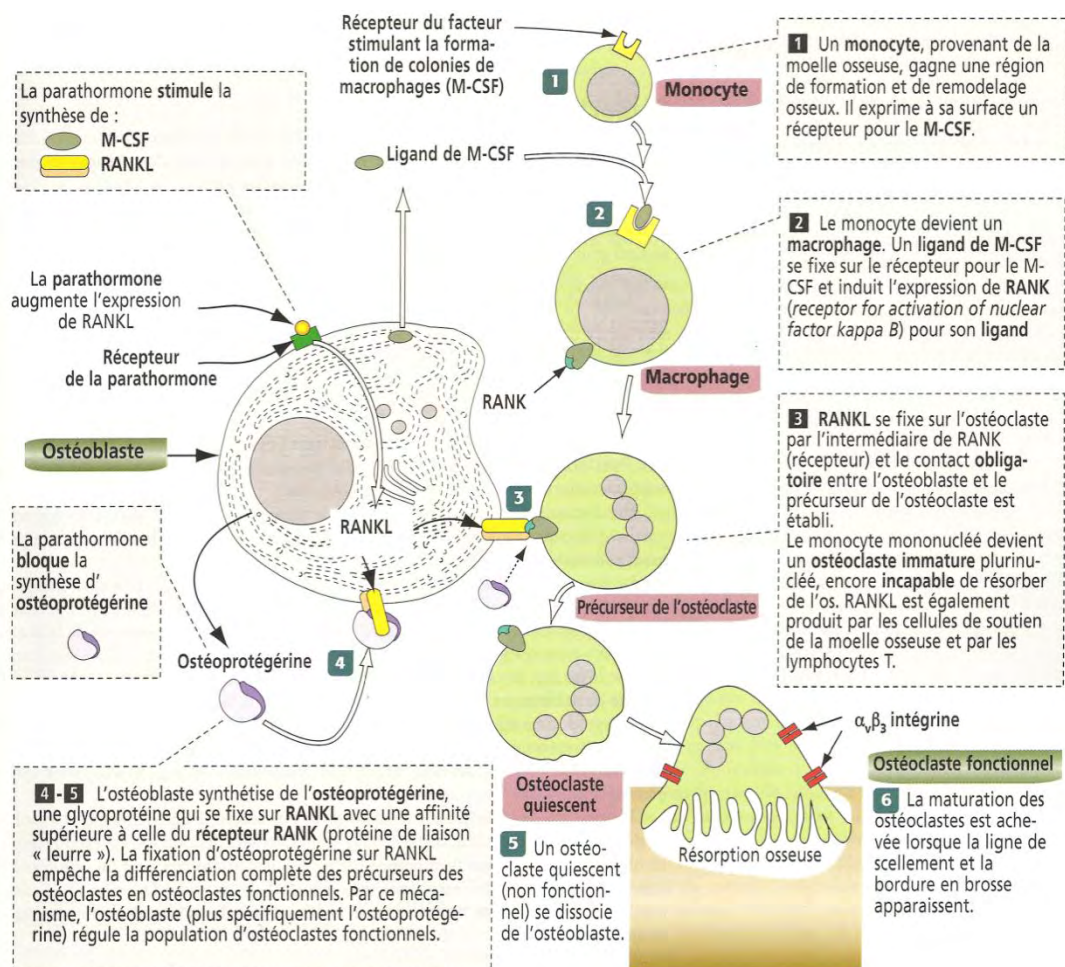


Figure 3-3 : Régulation de la différenciation des ostéoclastes par les ostéoblastes [Kierszenbaum 2006]

1. 2. 2. La résorption du tissu osseux mature

L'ostéoclaste est une cellule multinucléée, de grande taille (50-100µm), fortement polarisée associée à une cavité peu profonde : la *lacune de Howship* (figure 3-4 ; 1). Les ostéoclastes doivent impérativement s'accrocher à la matrice osseuse pour exercer leur fonction de résorption osseuse. Ainsi, leur activation ne va avoir lieu qu'une fois les cellules ancrées à la matrice osseuse sur la zone à résorber. Cet ancrage est en particulier dépendant de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

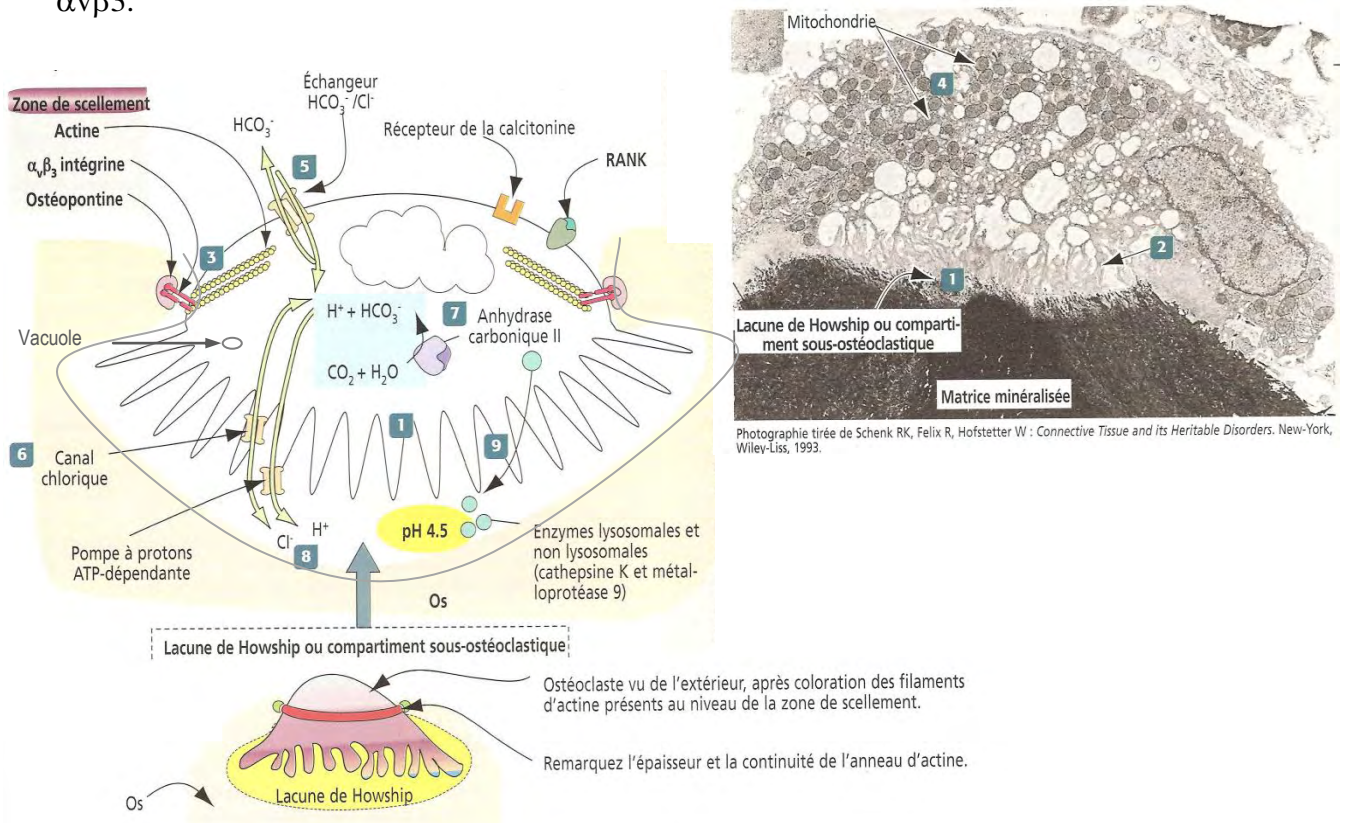


Figure 3-4 : (A) Schéma descriptif du fonctionnement biologique d'un ostéoclaste [Kierszenbaum 2006] (B) Photographie d'un ostéoclaste [Kierszenbaum 2006]

De façon plus précise, lorsque l'ostéoclaste est situé sur une zone à résorber, il va se polariser et la membrane plasmique au contact de l'os va alors s'organiser en deux domaines spécialisés : (1) la « *bordure en brosse* » (*ruffled border*) (figure 3-4; 2), face active en contact avec la lacune et (2) *la zone d'ancrage* ou *zone de scellement*; présente sur le pourtour de la bordure, lieu d'adhésion de la membrane cellulaire où vont s'accumuler des filaments d'actine qui, associés à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et à l'ostéopontine forment cette zone (figure 3-4; 3).

Ensuite, les deux phases constitutives de la matrice osseuse, phases minérale et organique, sont successivement dissoutes et dégradées. Ainsi, la résorption débute par une libération de protons (H^+) générés par l'anhydrase carbonique II, via les réactions suivantes :



L'ion H^+ est excrété dans la lacune de Howship via une pompe à protons ATPase dépendante (figure 3-4;**8**) pour créer un environnement acide indispensable à la dissolution de l'os minéralisé ; et les ions bicarbonates sont libérés grâce à une pompe échangeuse HCO_3^-/Cl^- (figure 3-4;**5**) afin de maintenir un pH neutre dans la membrane cytoplasmique. Les ions Cl^- ainsi créés sont excrétés dans la lacune par un canal chlorique (figure 3-4;**6**) et s'associent au proton pour donner l'acide chlorhydrique qui acidifiera la lacune de Howship et favorisera **la dissolution des cristaux d'apatite**. Ensuite, l'ostéoclast libère dans la lacune des enzymes lysosomiales (figure 3-4;**9**) : la *cathepsine K*, protéine produite en abondance et la métalloprotéase *MMP9* notamment, qui **dégrade les fibres de collagène** de type I puis l'enzyme phosphatase acide tartrate résistante (*TRAP*) dégradera l'os.

Cependant, lors de la résorption, le calcium ionisé libéré est réabsorbé engendrant une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} qui entraîne une dépolarisation de l'anneau périphérique d'actine. Par conséquent, l'ostéoclast se détache de la surface et lorsque la concentration en calcium diminuera, *via* une exocytose (« wash out »), la cellule reconstituera son anneau d'actine et se déplacera quelques micromètres plus loin pour éroder une nouvelle zone. Une fois la résorption terminée, l'ostéoclast entre en apoptose.

La représentation schématique présente en figure 3-5, établie par Saltel *et al.* illustre l'action des ostéoclastes et du cytosquelette d'actine durant la résorption d'un substrat d'apatite minéralisé [Saltel *et al.* 2004].

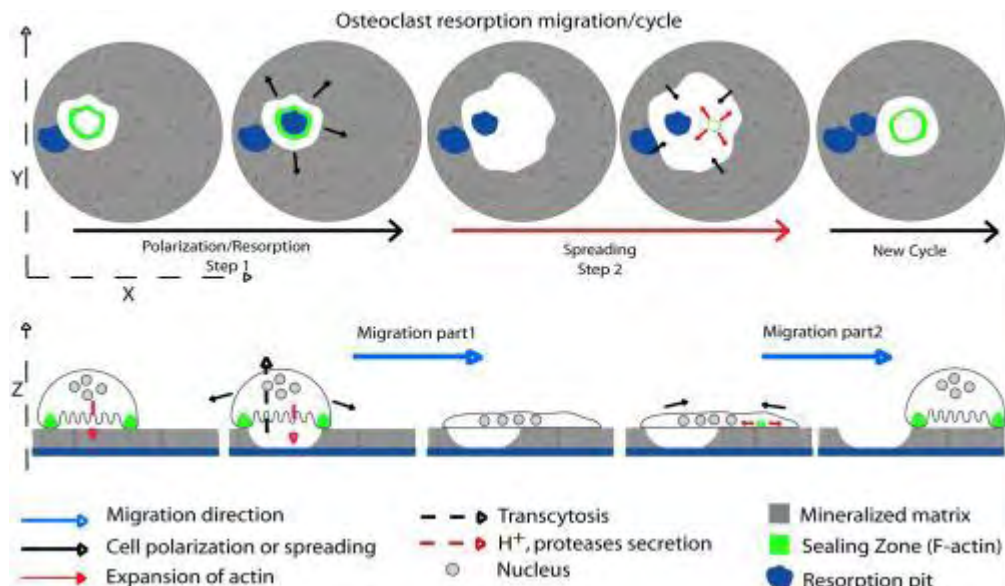


Figure 3-5: Représentation schématique des ostéoclastes et du cytosquelette d'actine durant la résorption d'un substrat d'apatite minéralisé [Saltel *et al.* 2004].

II. Etat de l'art des interactions entre phosphates de calcium, bisphosphonates et cellules osseuses

Les interactions entre les molécules de BPs et les cellules osseuses, ostéoblastes et ostéoclastes font l'objet de nombreuses études afin de mettre en évidence les mécanismes d'action des BPs. Fleisch, a été l'un des premiers [Fleisch 2000] à montrer que les molécules de BPs avait un effet inhibiteur de la résorption osseuse par un effet direct sur les OC et un effet indirect sur les OB (figures 3-6 et 3-7).

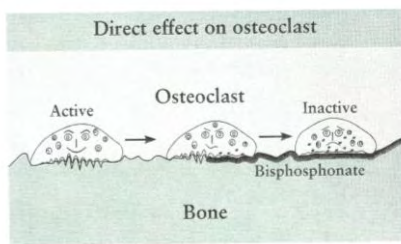


Figure 3-6: Mécanisme d'action direct sur les ostéoclastes [Fleisch 2000]

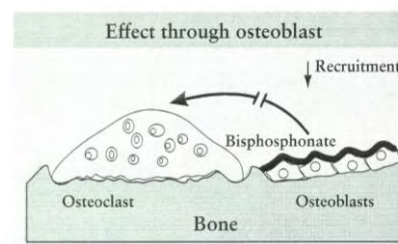


Figure 3-7: Mécanisme d'action indirect sur les ostéoblastes [Fleisch 2000]

Différentes études ont confirmé par la suite l'effet inhibiteur de plusieurs molécules de BPs sur le recrutement et/ou la différenciation des ostéoclastes [Hughes *et al.* 1989; Murakami *et al.* 1995; David *et al.* 1996; Nishikawa *et al.* 1996] [Flanagan *et al.* 1991]. Ces travaux mettent également en avant l'action indirecte des ostéoblastes sur l'inhibition de l'ostéoclastogénèse lors d'études en coculture OC/OB [Sahni *et al.* 1993; Nishikawa *et al.* 1996]. Néanmoins, d'autres auteurs ont montré que l'action des BP agissait directement sur les ostéoblastes. En effet, diverses molécules de BPs (pamidronate, alendronate, risédronate et zolédronate notamment) semblent favoriser la prolifération et la différenciation de cellules humaines issues de l'os trabéculaire (hOB) ou des cellules mésenchymateuses humaines issues de la moelle osseuse (HBMSC) [Reinholz *et al.* 2000; Fromigue *et al.* 2002; Im *et al.* 2004; Von Knoch *et al.* 2005]. Ainsi, les molécules de BPs semblent agir à la fois sur les ostéoclastes et les ostéoblastes. Dans le cas du tiludronate, Bonjour *et al.* ont montré que le tiludronate possédait une action inhibitrice sur la résorption osseuse dose-dépendante [Bonjour *et al.* 1995] et qu'il augmentait la masse et la résistance du tissu osseux [Ammann *et al.* 1993; Murakami *et al.* 1994; Ohnishi *et al.* 1997].

Les interactions entre les phosphates de calcium apatitiques et les cellules osseuses sont aussi le fruit de nombreuses études. Les composés phosphocalciques apatitiques aussi bien les composés stœchiométriques : HA et β TCP notamment [Hott *et al.* 1997; Hing *et al.* 1999; Redey *et al.* 2000; Pieters *et al.* 2010] que les apatites nanocristallines [Kim *et al.* 2001; Midy

et al. 2001 a; Landi *et al.* 2005] en passant par les céramiques [Yamada *et al.* 1997; Detsch *et al.* 2008], les ciments [Yuasa *et al.* 2004; Julien *et al.* 2007] ou encore les microsphères injectables [Barrias *et al.* 2004] ont fait l'objet de nombreuses études d'interactions avec des ostéoblastes et des ostéoclastes afin d'étudier leur comportement cellulaire pour des applications en remplacement de tissu osseux.

Cependant, peu de travaux rapportent les mécanismes d'interaction des cellules osseuses avec des biomatériaux à base de phosphate de calcium modifiés par des molécules de bisphosphonates. L'étude de Panzavolta *et al.* [Panzavolta *et al.* 2009] porte sur la réponse *in vitro* de cellules ostéoblastiques (MG63) et ostéoclastiques humaines au contact d'un ciment phosphocalcique comportant deux types de molécules de BPs : le pamidronate et l'alendronate ajoutés dans la phase liquide du ciment à différentes concentrations lors de son élaboration. Les résultats de cette étude mettent en évidence l'effet des BPs en tant qu'inhibiteur de l'ostéoclastogénèse et comme agent favorisant la prolifération et la différenciation ostéoblastique. Les travaux de Luo *et al.* [Luo *et al.* 2008] menés sur l'interaction entre une lignée de cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 et des composites clodronate-*scaffold* de céramique à base d'hydroxyapatite, obtenus par immersion des biocéramiques dans une solution de BP, ne met pas en évidence d'effet néfaste des BPs sur l'expression des gènes. Les travaux de Boanini *et al.* discutent, quant à eux, de l'interaction entre des nanocomposites hydroxyapatite-alendronate [Boanini *et al.* 2008] et hydroxyapatite-zolédronate [Boanini *et al.* 2011] avec des ostéoblastes (MG63) et des ostéoclastes humains. Les molécules de BP sont ajoutées lors de la synthèse, après addition du di-ammonium hydrogénéphosphate au nitrate de calcium dans le cas de l'alendronate et ajoutées à la solution de phosphate dans le cas du zolédronate. Les auteurs montrent l'influence de l'alendronate aussi bien sur les ostéoblastes que sur les ostéoclastes. En effet, la présence de BPs favorise l'activation des OB et le processus de minéralisation de la matrice extracellulaire et inhibe la prolifération des OC. De plus, selon les auteurs, les tests réalisés en coculture OC/OB semblent exalter les effets des BPs sur les cellules osseuses [Boanini *et al.* 2011]. Les travaux de Fauchoux *et al.* [Fauchoux *et al.* 2009] portent sur l'interaction entre des cellules osseuses, cellules ostéoclastiques issues d'os de lapin et cellules ostéoblastiques primaires d'origine murine. Ces travaux décrivent des apatites déficientes en calcium chargées en zolédronate par mise en suspension de ces poudres d'apatites dans une solution aqueuse de zolédronate pendant deux jours. Les auteurs ont ainsi montré l'aptitude de ces apatites déficientes en calcium à libérer le zolédronate en inhibant la résorption ostéoclastique de façon dose-dépendance.

Remarquons qu'aucune des ces études n'utilise des apatites nanocristallines biomimétiques en tant que biomatériau bien qu'elles représentent l'un des modèles les plus proches du minéral osseux.

Aussi dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude du comportement des cellules osseuses, ostéoblastes et ostéoclastes, au contact de différents modèles osseux : NCA1, mimant un os jeune, et NCA2, mimant un os mature, comportant ou non des molécules de BPs afin de mieux connaître l'effet des BPs en tant que traitement local sur le minéral osseux en condition *in vitro*.

B. Etude des supports apatitiques préalable aux tests *in vitro*

Divers travaux issus de la littérature montrent que les caractéristiques de surface des matériaux telles que l'état de rugosité, la topographie de surface, l'énergie de surface, la nature des éléments constitutifs de la surface affectent l'adhésion cellulaire [Schwartz *et al.* 1994; Redey *et al.* 1999; Redey *et al.* 2000; Rouahi *et al.* 2006; Nakamura *et al.* 2010]. Aussi, dans cette partie, nous nous attacherons à caractériser les supports avant leur mise en culture cellulaire.

I. Elaboration de supports apatitiques

I. 1. Protocole d'adsorption

Nous avons choisi de tester les deux supports NCA1 et NCA2, modèles d'un os « jeune » et « mature » respectivement, et une seule concentration de tiludronate correspondant au palier d'adsorption des isothermes précédemment étudiés.

Pour répondre à la demande importante de matériaux nécessaires à la réalisation des tests cellulaires, nous avons réalisé des adsorptions en grande quantité. En effet, les quantités d'adsorbant et d'adsorbat ont dû être multipliées par dix par rapport au protocole d'adsorption utilisé dans le chapitre précédent, mais les étapes du mode opératoire et la proportion adsorbant/adsorbat restent inchangées. Ainsi, nous avons dispersé 500 mg de poudres d'apatites nanocristallines mal cristallisées tamisées à 125 µm dans 50 mL de solution aqueuse de tiludronate constituant le milieu d'adsorption à une concentration de 2g/L, correspondant au palier des isothermes d'adsorption, soit $Q_{ads} = 2,47$ mM et 1,99 mM pour NCA1 et NCA2 respectivement.

Après adsorption, afin de vérifier que la quantité adsorbée est identique à celle obtenue lors des adsorptions classiques, une mesure par spectrophotométrie UV de la concentration en tiludronate dans la solution ($\lambda=265$ nm) a été effectuée.

Ensuite des lots homogènes des plusieurs grammes de poudres NCA1 et NCA2 ont ainsi été réalisés avec l'ensemble des poudres de même nature tamisées mélangées après adsorption (notées « NCA+BP »). Ces lots de poudres seront utilisés pour l'élaboration des supports apatitiques sous forme de pastilles.

I. 2. Pastilles

I. 2. 1. Réalisation de pastilles NCA

Les supports apatitiques ont été élaborés sous forme de pastilles de 1cm de diamètre par pressage uniaxial à l'aide d'une presse d'essai mécanique *Hounsfield, modèle H25K-S*, sous une pression de 190MPa appliquée. Le temps de contact a été défini suite aux tests préalables (voir paragraphe II.2.1.). Lors du pressage uniaxial, des joints en téflon, nécessaires à la réalisation des pastilles, ont été placés de part et d'autre de la poudre entre les pistons.

I. 2. 2. Stérilisation des pastilles NCA

La technique envisagée et disponible dans les laboratoires biologiques pour stériliser les pastilles en vue des tests cellulaires est la stérilisation par UV. Avant de procéder à cette étape indispensable pour l'étude *in vitro*, nous avons vérifié par spectroscopie infrarouge que la molécule de principe actif n'était pas altérée lors cette opération. La figure 3-8 présentant les spectres FTIR du tiludronate avant et après stérilisation confirme que cette technique n'engendre pas d'endommagement de la molécule. Aussi, nous avons stérilisé les pastilles servant à l'étude *in vitro* à l'aide de lampes UV avec une exposition d'une durée de 15 minutes sur chaque face.

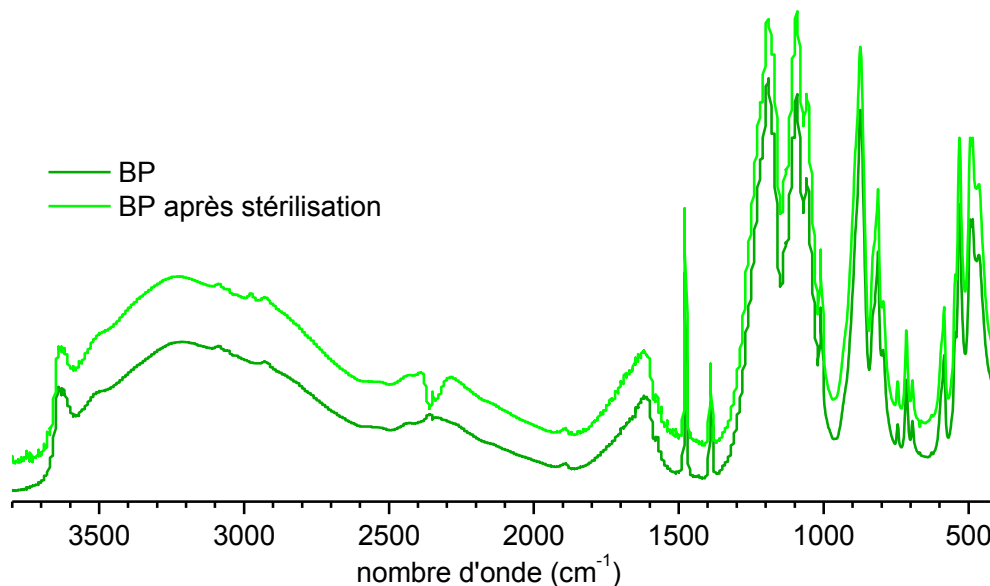


Figure 3-8: Spectres FTIR du tiludronate stérilisé par UV ou non

II. Caractérisation des supports apatitiques

II. 1. Caractérisation physico-chimique des pastilles

II. 1. 1. Porosimétrie à mercure

La porosimétrie à mercure est une technique basée sur la mesure de la quantité de mercure pouvant être insérée dans les pores (vides interstitiels interconnectés ou non) d'un solide à différentes pressions (intrusion de mercure). Cette technique permet de déterminer quantitativement la structure poreuse de solides, notamment la distribution du volume et de la taille des pores, la densité apparente du solide et le taux de porosité ouverte. Le détail de l'analyse est présenté en annexe.

Les taux de porosité ouverte des pastilles sont respectivement de 38,6% pour NCA1 et de 43,5% pour NCA2. Des différences sont donc constatées entre les pastilles.

La distribution de la taille des pores, soit le logarithme du volume d'intrusion du mercure en fonction du diamètre des pores est présentée en figure 3-9 pour chacune des compositions.

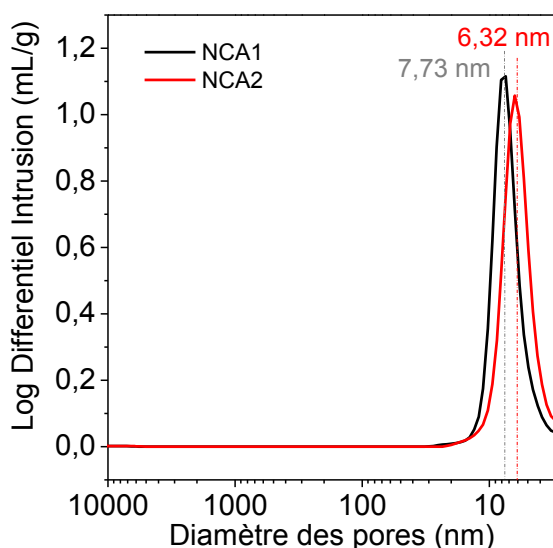


Figure 3-9:
Distribution de la taille des pores au sein
des pastilles de NCA1 et NCA2

Les pastilles possèdent des nanoporosités dont les diamètres avoisinent 6,32 nm pour NCA2 et 7,73 nm pour NCA1. La nature du support semble avoir peu d'influence sur la taille des nanoporosités.

II. 1. 2. FTIR

Une analyse par spectroscopie FTIR a été réalisée sur les poudres initiales NCA1 et NCA2 et sur les pastilles NCA1 et NCA2 en vue de leur comparaison afin de vérifier que la mise sous forme de pastille des composés synthétisés n'a pas engendré de modifications. Les spectres d'absorption FTIR obtenus sont regroupés sur la figure 3-10.

La pastille étant compressée à une pression importante (190MPa), nous n'avons pas pu « gratter » sa surface puisque la pastille très fragile se raye et se casse. Aussi, notons que les spectres FTIR des pastilles présentés en figure 3-10 correspondent aux pastilles entières soit au cœur et à la surface indistinctement.

Les spectres FTIR des pastilles ne présentent aucune bande supplémentaire ou déplacement de bande en comparaison avec les spectres des poudres correspondantes. La nature des supports reste donc inchangée et la compaction des poudres à l'aide des joints téflon ne semblent pas induire de contamination, ce qui devra être vérifié par une technique d'analyse de surface telle que l'XPS/ESCA. Les bandes FTIR des pastilles ne présentent pas de changement d'intensité, ou de dédoublement de bandes par rapport aux poudres, en particulier les bandes phosphate caractéristiques de l'environnement apatitique. On ne peut donc pas conclure à un changement de cristallinité, ce qui devra être corroboré par analyse DRX.

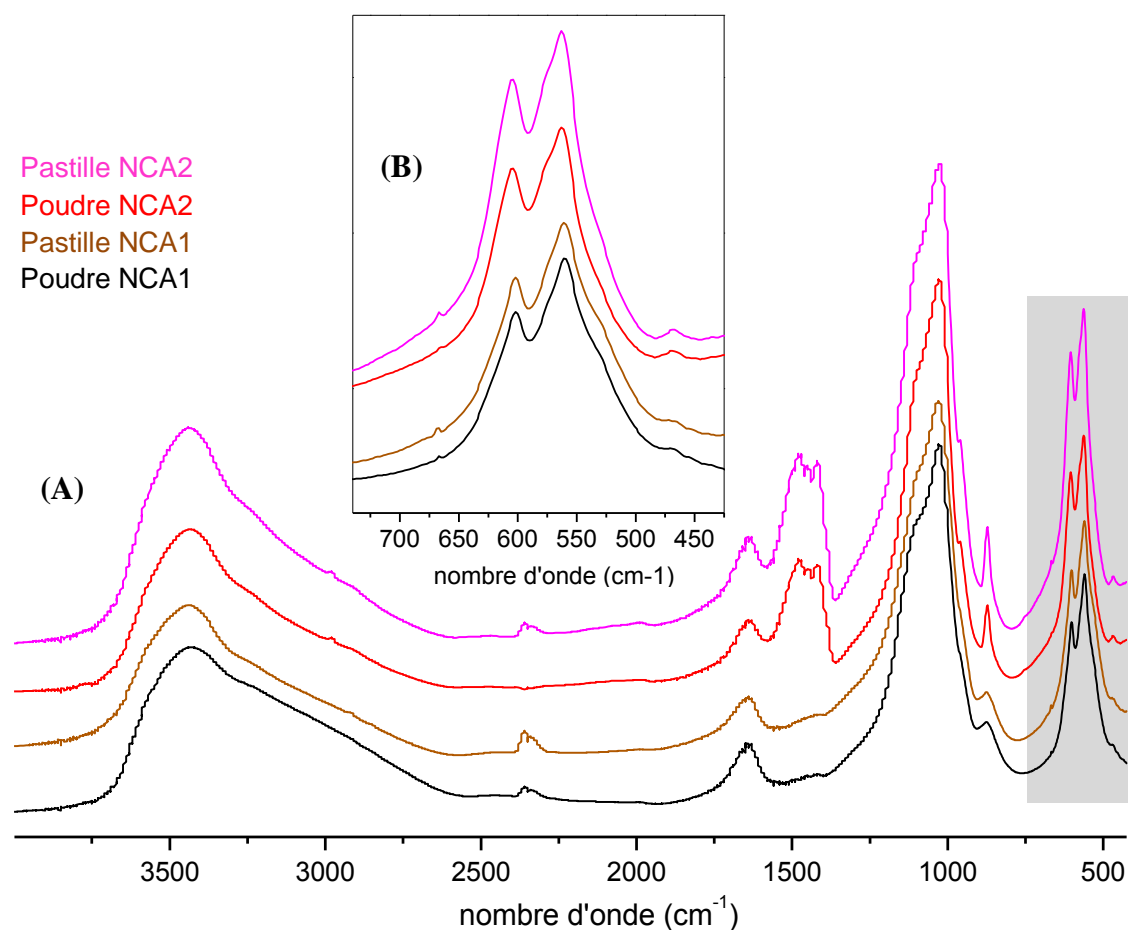


Figure 3-10: Spectres FTIR des poudres et des pastilles NCA1 et NCA2
(A) : spectres entiers (4000-420 cm⁻¹), (B) : spectres focalisés sur la région 740-425 cm⁻¹

II. 2. Caractérisation de la surface

II. 2. 1. Analyse quantitative par XPS/ESCA

La technique XPS est une technique spectroscopique quantitative qui permet l'analyse chimique de l'extrême surface des matériaux grâce à l'analyse de l'énergie des photoélectrons émis lors de l'excitation de la surface par les RX. Aussi les pollutions de surface vont pouvoir être détectées à l'aide de cette technique, détaillée en annexe.

Une analyse par XPS/ESCA (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy/Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*) a été réalisée sur différentes pastilles afin de vérifier les éléments présents en surface des pastilles et une éventuelle contamination de la surface par le fluor. En effet, la présence de téflon, substance fortement hydrophobe, pourrait modifier les caractéristiques de surface et gêner l'adhésion cellulaire. Le détail des conditions d'analyses est présenté en annexe.

Les pastilles ont dû préalablement être mises à l'étuve à 100°C pendant 24h puis placées sous un vide primaire pendant plusieurs heures par précaution afin de diminuer raisonnablement le taux d'hydratation des pastilles avant leur insertion dans la chambre et de préserver le vide de la chambre d'analyse. Les analyses ont été répétées sur plusieurs endroits de la pastille afin de confirmer l'homogénéité du composé.

Dans un premier temps, une analyse de la surface d'une pastille de composition NCA1 pressée à 190MPa avec un temps de contact de 10 secondes avec l'aide de joints téflon (*échantillon 1*) et sans l'aide de joints téflon (*échantillon 0*) a été réalisée. Les éléments détectés sur les échantillons sont l'oxygène, le carbone, le calcium, le phosphore et le fluor. Le tableau 3-1 rassemble l'énergie de liaison de chacun des éléments chimiques détectés et l'identification de leur environnement chimique.

Eléments	O	C	Ca	P	F
Energie de liaison	531,0±0,5 eV (O1s)	285,0±0,4 eV (C1s)	347,0±0,5 eV (Ca2p ^{3/2})	133,0±0,3 eV (P2p)	689,23±0,04 eV (F1s)
Environnement chimique	O ^{-II}	C aliphatique de contamination	Ca ^{+II}	P ^{+V}	F

Tableau 3-1: Eléments chimiques détectés par analyse XPS/ESCA sur la surface des pastilles ainsi que les énergies de liaison correspondantes

Les énergies de liaison obtenues pour les éléments calcium, phosphore et oxygène correspondent aux énergies théoriques recensées pour l'hydroxyapatite et l'énergie de liaison de l'élément fluor correspond à l'énergie de liaison recensée pour le téflon et non pour la

fluorhydroxyapatite (tableau 3-2). L'élément carbone est quant à lui associé à une contamination au contact de l'air.

<i>Eléments</i>	<i>Configuration</i>	<i>Formule</i>	<i>Energie de liaison</i>	<i>Références</i>
Ca	2p ^{3/2}	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	347,80 eV	[Landis <i>et al.</i> 1984]
P	2p ^{3/2}	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	133,80 eV	
O	1s	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	531,80 eV	
F	1s	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	684,60 eV	[Landis <i>et al.</i> 1984]
		CF ₂	689 eV	[Taylor <i>et al.</i> 1978]

Tableau 3-2: Tableau de base de données XPS recensant les énergies de liaison des différents éléments observés en surface des supports apatitiques

Les résultats ne montrent aucune présence de fluor sur la pastille pressée sans joint téflon (*échantillon 0* sur la figure 3-11) alors que la surface de la pastille réalisée à l'aide de joints téflon contient 13,8 %at. de fluor (*échantillon 1* sur la figure 3-11). Par conséquent, l'utilisation de joints téflon contribue à une contamination de la surface par le fluor. Ce fait étant avéré, nous avons étudié l'impact du temps de contact lors de la compression mais aussi des différentes étapes ultérieures nécessaires à la mise en culture de ces pastilles sur la teneur en fluor. Ainsi, les mêmes analyses ont été réalisées sur des pastilles ayant subi une compression différente (un temps de contact de 2 secondes au lieu de 10), une stérilisation à l'aide de lampe UV (protocole de stérilisation utilisé par la suite pour les tests cellulaires) ou encore une mise au contact du milieu de culture (IMDM Glutamax, *Invitrogen*) contenant notamment des acides aminées, des vitamines et des sels inorganiques (la composition exacte est exposée en annexe). Le tableau 3-3 récapitule les différences existant entre les échantillons analysés.

<i>échantillon 2</i>	Pastille compressée avec un temps de contact de 2 secondes en présence des joints en téflon
<i>échantillon 3</i>	Pastille compressée avec un temps de contact de 10 secondes (I.2.1) stérilisée à l'aide de lampes UV (15 minutes d'exposition sur chaque face)
<i>échantillon 4</i>	Pastille compressée avec un temps de contact de 10 secondes, stérilisée et mise en contact avec le milieu de culture (IMDM Glutamax, <i>Invitrogen</i>)

Tableau 3-3: Nomenclature des échantillons

L'évolution de la teneur en fluor présent en surface des différents échantillons obtenus par analyse XPS/ESCA est exposée en figure 3-11.

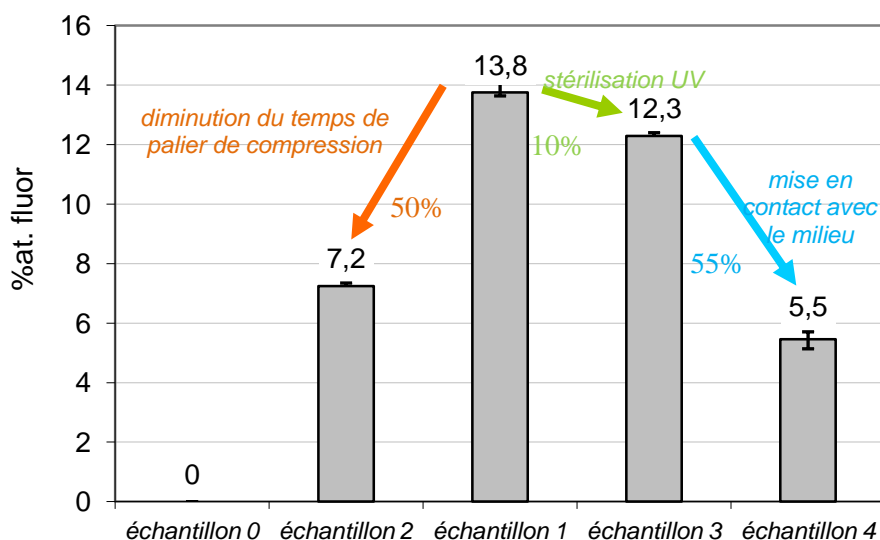


Figure 3-11: Teneurs en fluor, exprimés en pourcentage atomique, présents en surface des différents échantillons obtenus par analyse XPS/ESCA.

échantillon « 0 » : pastille NCA1 obtenue sans joint en téflon lors de la compression

échantillon « 1 » : pastille NCA1 obtenue avec joints en téflon lors de la compression avec $t_{\text{contact}}=10s$

échantillon « 2 » : pastille NCA1 obtenue avec joints en téflon lors de la compression avec $t_{\text{contact}}=2s$

échantillon « 3 » : échantillon « 1 » stérilisé par lampes UV

échantillon « 4 » : échantillon « 3 » mis en puits de culture en présence d'IMDM

La constatation globale observée est la diminution de la teneur en fluor lorsque le temps de contact est diminué (perte de 50%), lors de la stérilisation (perte de 10%) et lors de la mise en milieu de culture cellulaire (perte de 55%). La perte de fluor est la plus importante lors de la mise en milieu de culture. Ces observations sont en accord avec l'étude menée par Redey *et al.* [Redey *et al.* 2000] sur le comportement de cellules ostéoblastiques humaines sur des pastilles d'hydroxyapatite et d'apatite carbonatée de type A. En effet, les analyses XPS de la surface de ces pastilles font aussi état d'une contamination par le fluor. Le protocole d'élaboration des pastilles est l'une des origines de contamination envisagée par les auteurs. Toutefois, les analyses réalisées sur les pastilles après les tests cellulaires présentent un pic de fluor fortement réduit ceci peut être attribué soit à une élimination des particules de téflon dans le milieu de culture soit à la formation d'une couche apatitique en surface suite à la mise en contact avec le milieu de culture et/ou l'action des cellules ostéoblastiques.

Ainsi, afin de minimiser les inconvénients liés à la présence de téflon, nous avons réalisé nos pastilles avec un temps de contact de 2 secondes au lieu de 10 secondes (en deçà, la pastille ne peut être obtenue). De plus, notons que l'étape de stérilisation des pastilles est obligatoire pour réaliser les tests cellulaires ainsi que la mise en suspension préalable dans le milieu de culture, afin d'aboutir à une mise en équilibre de la surface.

II. 2. 2. DRX

Dans un premier temps, les pastilles NCA1 et NCA2 ont été caractérisées par diffraction des rayons X en configuration θ - 2θ et les digrammes obtenus ont été comparés à ceux des poudres d'apatites nanocristallines réalisés dans les mêmes conditions.

Les diagrammes de diffraction des rayons X des pastilles et des poudres : NCA1 et NCA2 sont exposés en figure 3-12. Des différences sont observées entre les diffractogrammes des poudres et des pastilles. Ces différences apparaissent aussi bien dans le cas du composé NCA1 que dans celui du NCA2. En effet, les pics de diffraction présents aux angles 2θ égaux à $25,9^\circ$ et $53,2^\circ$ correspondant respectivement aux raies (hkl) : (002) et (004) selon la fiche JCPDS-ICDD 9-432, voient leurs intensités diminuer suite à la compression de la poudre. Ainsi, la compression des poudres par pressage uniaxial selon la normale à la surface des composés semble aligner les plaquettes de NCA parallèlement à la surface favorisant ainsi une orientation préférentielle des nanoparticules comme schématisé en figure 3-13. La couche hydratée serait donc préférentiellement exposée en surface des pastilles.

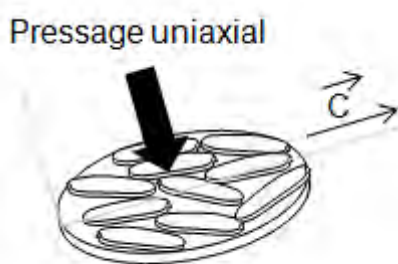


Figure 3-13:
Schématisation de l'orientation préférentielle des nanoparticules engendrée par l'étape de pressage uniaxial

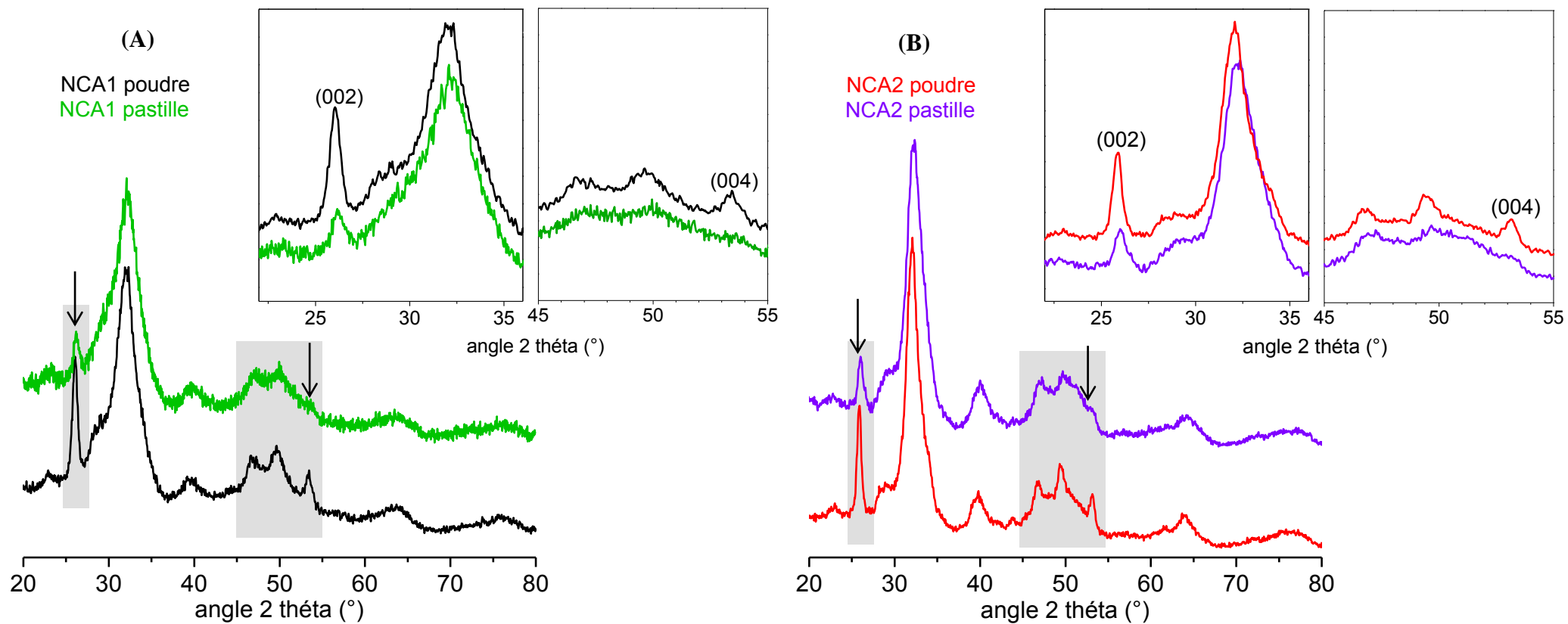


Figure 3-12: Diagrammes de diffraction des rayons X des composés NCA1 (A) et NCA2 (B) sous forme de poudres et de pastilles

Dans un second temps, les pastilles ont été caractérisées par diffraction des RX en configurant le diffractomètre en mode rasant selon différents angles d'incidence Ω (2° et 4°) afin de déterminer si l'orientation préférentielle constatée varie avec la profondeur de pénétration des rayons X. La figure 3-14 présente ces diagrammes de diffraction des rayons X.

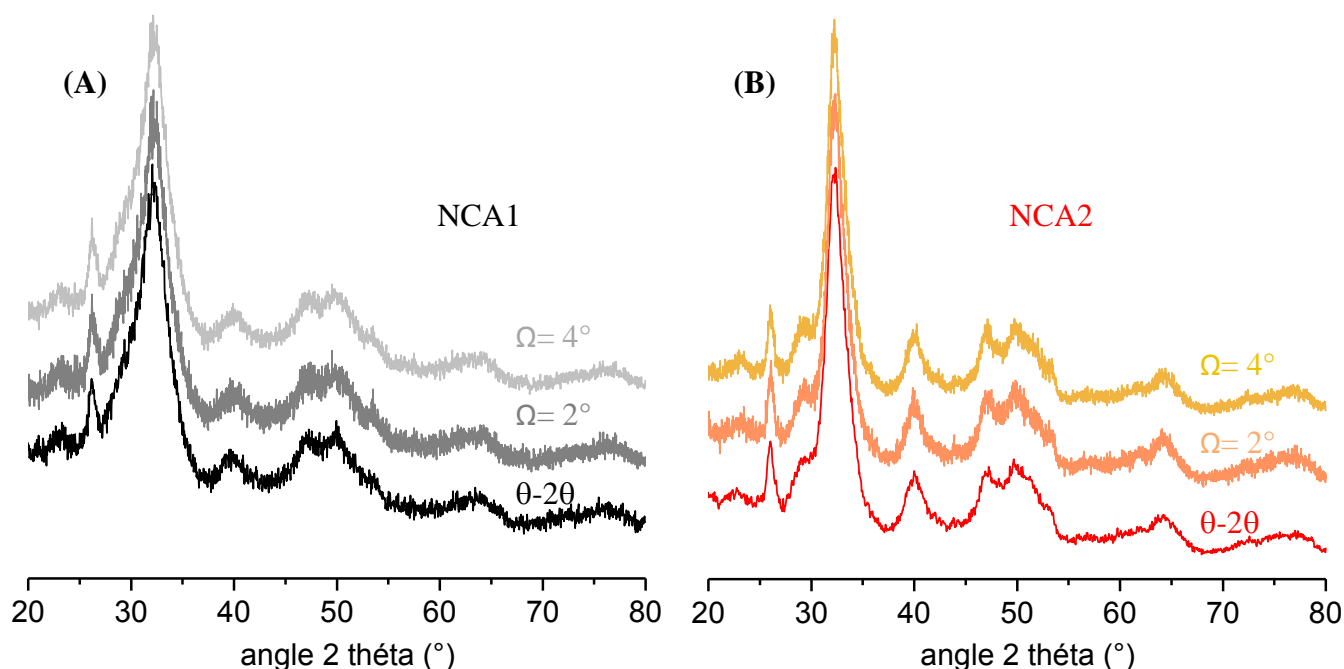


Figure 3-14: Diagrammes de diffraction des rayons X des pastilles NCA1 (A) et NCA2 (B) avec le diffractomètre en configuration $\theta-2\theta$ ou en configuration rasante avec $\Omega=2^\circ$ ou 4°

Les diagrammes de RX obtenus en configuration $\theta-2\theta$ et en configuration rasante avec $\Omega=2^\circ/4^\circ$ ne présentent pas de différences notables. Aucune phase supplémentaire n'est constatée sur les pastilles de NCA. L'orientation préférentielle constatée n'est donc pas juste présente en surface.

II. 2. 3. RAMAN

Les spectres Raman des composés NCA1 et NCA2 sous forme de poudres et de pastilles sont rassemblés sur la figure 3-15. Une normalisation de la bande vibrationnelle $\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1}) a été réalisée et les artefacts liés à l'appareillage ont été corrigés en vue de leur analyse comparative.

Les spectres des pastilles présentent les mêmes allures que celles des poudres. Toutefois, l'apparition d'une bande supplémentaire à 880 cm^{-1} est constatée sur les spectres des pastilles NCA1 et NCA2 (figure 3-15). La contamination par le fluor a donc été la première hypothèse émise sur l'origine de cette bande. Aussi, un des joints en téflon utilisé lors du pressage a été

analysé par spectroscopie Raman. La figure 3-16 qui reporte le spectre Raman du téflon infirme cette hypothèse puisqu'aucune bande à 880 cm^{-1} n'est observée.

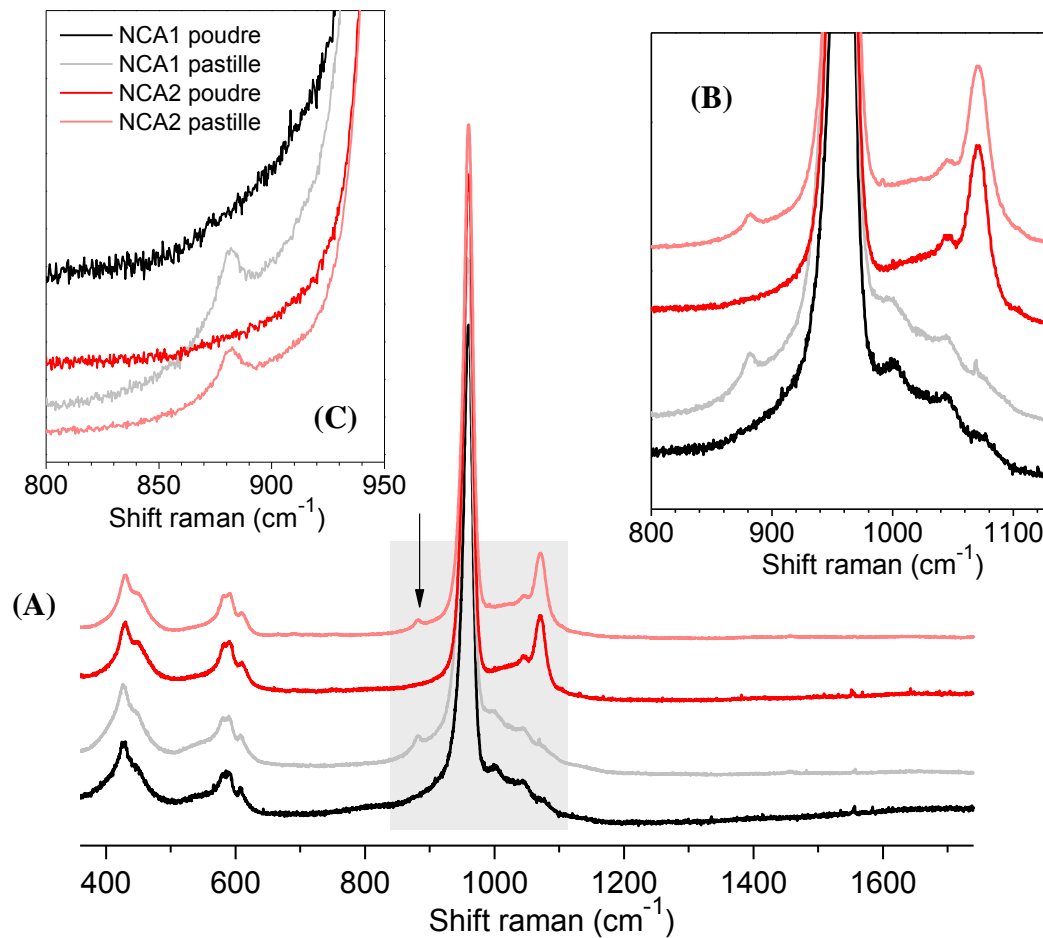


Figure 3-15: Spectres Raman des composes NCA1 et NCA2 sous forme de poudre et de pastille
 (A) : spectres entiers ($350\text{-}1750\text{cm}^{-1}$)
 (B) : spectres focalisés sur la région $800\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$
 (C) : spectres focalisés sur la région $800\text{-}950\text{ cm}^{-1}$

La deuxième hypothèse alors envisagée est une exaltation de l'observation des bandes HPO_4 sur les pastilles liée à l'orientation préférentielle des plaquettes.

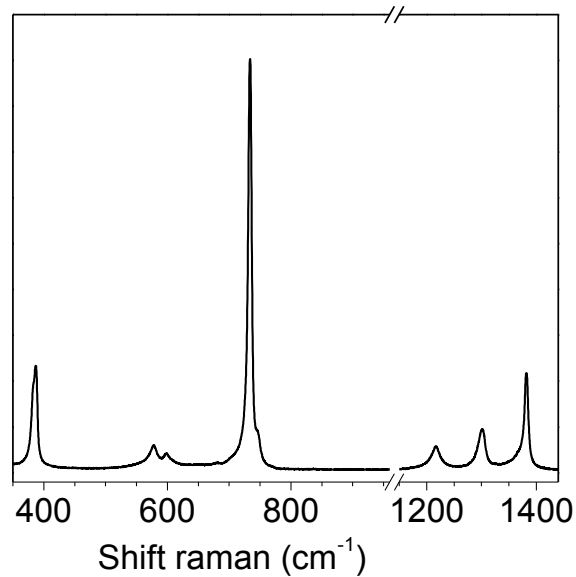


Figure 3-16: Spectre Raman d'un joint en téflon

II. 3. Etude de la cinétique de mouillabilité sur les pastilles NCA

L'adhésion de macromolécules d'intérêt biologique sur la surface de biomatériau est attribuée notamment aux propriétés hydrophile/hydrophobe du substrat. La mouillabilité apparaît donc comme un facteur important dans le recrutement et l'adhésion des cellules biologiques [Lahann *et al.* 2005; Wilson *et al.* 2005; Aronov *et al.* 2006; Aronov *et al.* 2007]. Les études de mouillabilité menées sur des apatites montrent que les propriétés de surface affectent l'adhésion des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques et plus particulièrement leur étalement [Redey *et al.* 1999; Redey *et al.* 2000; Rouahi *et al.* 2006; Nakamura *et al.* 2010]. Des cinétiques de mouillabilité ont été réalisées sur les différents supports apatitiques afin de définir leur caractère hydrophile/hydrophobe et leur comportement au contact d'un milieu aqueux.

La cinétique de mouillabilité, propriété d'un liquide à s'étaler à la surface d'un solide, caractérisée par l'angle de contact θ entre une goutte de liquide et le support (figure 3-17), a été étudiée selon la méthode de la goutte sessile par mesure directe à l'aide d'un *Digidrop* (annexe) sur les pastilles élaborées afin de prendre connaissance de leur comportement au contact d'un milieu aqueux au vue de leur future immersion dans un milieu aqueux tel que le milieu de culture cellulaire. La méthode de la goutte sessile est basée sur l'analyse de la forme d'une goutte de liquide au repos sur une surface plane [Le Neindre 1993].

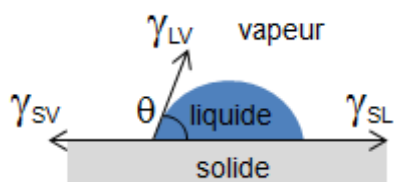


Figure 3-17:
Goutte de liquide à l'équilibre sur une surface solide

La mesure de l'angle de contact d'une goutte a été réalisée en fonction du temps afin de déterminer les cinétiques de mouillabilité de chacune d'elles. Les pastilles étudiées sont les pastilles d'apatites nanocristallines non maturées non carbonatées avec BP (NCA1+BP) et sans BP (NCA1) et les liquides choisis pour l'étude sont : l'eau distillée et le milieu de culture utilisé ultérieurement lors des tests cellulaires (IMDM Glutamax, *Invitrogen*). Ainsi, cette étude permet de connaître l'impact de la nature du milieu et de la présence du BP sur l'angle de contact.

Les cinétiques d'angle de contact sur pastille NCA1 d'une goutte d'eau distillée et d'IMDM sont reportées sur la figure 3-18. Pour chaque cinétique, l'expérience a été répétée trois fois. Aussi, la figure 318 présente la moyenne des trois cinétiques et leur écart-type pour chacune des configurations.

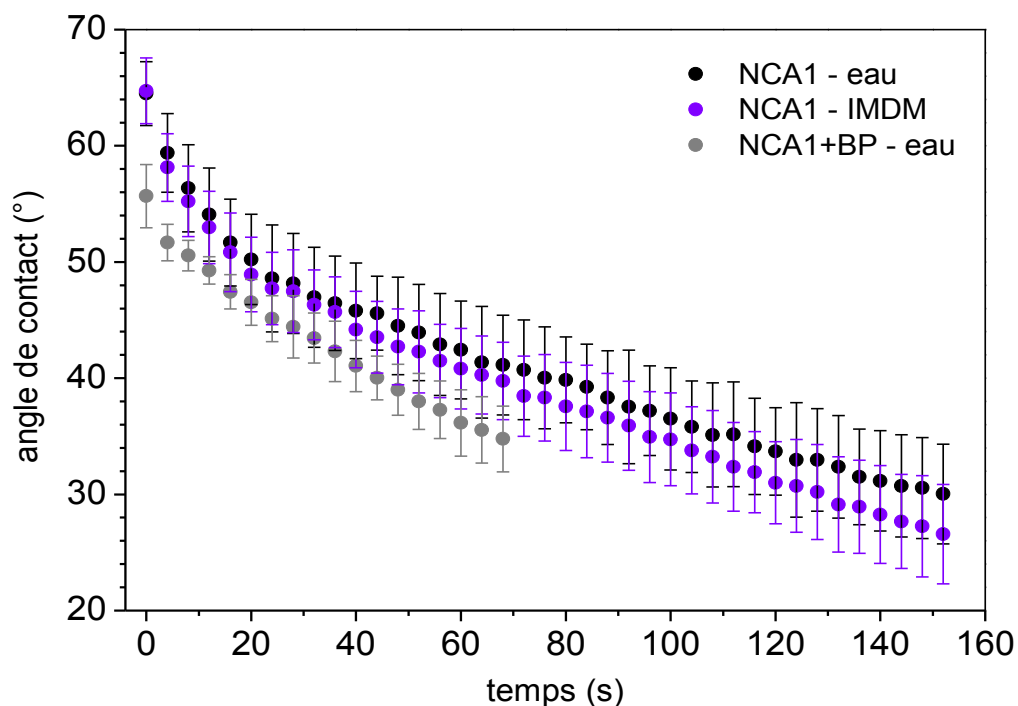


Figure 3-18: Evolution des angles de contact de l'eau et de l'IMDM en fonction du temps sur des pastilles NCA1 et NCA1+BP

Les cinétiques de mouillabilité des pastilles NCA1 présentent la même allure quel que soit le liquide utilisé (eau distillée ou IMDM). Lors de ces cinétiques, un étalement rapide les premières secondes puis progressif de la goutte est observé. Cet étalement est probablement

associé en partie à une percolation au travers des porosités présentes dans les pastilles. L'angle de contact θ à t_0 est de 65° pour la goutte d'eau ou d'IMDM sur la pastille NCA1. La nature du liquide n'engendre pas de différence. Aussi, la cinétique de mouillabilité a été réalisée sur la pastille NCA1+BP seulement avec une goutte d'eau distillée et est reportée sur la figure 3-18 en vue de comparaison avec NCA1. L'allure de la cinétique ainsi que la valeur de l'angle de contact à t_0 (56°) sont proches de celles obtenues avec les pastilles de NCA1. Toutefois, la cinétique menée sur les pastilles NCA1+BP est stoppée au bout de 60 secondes par rupture brutale des pastilles, laissant présumer de la création de tensions superficielles lors de la pré-adsorption du principe actif. Ainsi, l'adsorption de BP semble avoir une influence sur le comportement des pastilles au contact d'une goutte de liquide et leurs propriétés de surface. Les pastilles NCA2 ont aussi fait l'objet de l'étude avec de l'eau distillée. Toutefois, les données ne sont pas présentées car les pastilles se sont rompues brutalement de façon répétable de la même manière que NCA1+BP mais au bout de quelques secondes seulement. Les apatites maturées (NCA2), mieux cristallisées et possédant une couche hydratée moins importante, semblent donc plus sensibles à l'hydratation.

Le phénomène de rupture peut être expliqué de différentes façons. On sait qu'il existe une forte réaction exothermique lors de la mise en contact du support avec une solution aqueuse. En effet, Somrani *et al.* ont montré grâce à une étude de l'hydrolyse dans l'eau de TCP amorphe qu'un phénomène brutal lié à une réaction exothermique de courte durée apparaissait à l'instant même de l'immersion de la poudre dans l'eau pour atteindre un maximum au bout de 2 minutes et s'estompait ensuite [Somrani *et al.* 2005; Somrani 2010]. Une autre explication à cette fragmentation des pastilles pourrait être un gonflement des nanocristaux au contact de l'eau lié notamment à la réhydratation des ions minéraux présents dans la couche hydratée.

Notons que les pastilles ne se rompent pas lorsqu'on les immerge en totalité dans le milieu de culture. Ainsi faut-il distinguer l'effet d'hydratation exercée par une goutte sur un point unique de la surface de la pastille de la pression uniforme que subira cette même pastille lors de son immersion totale dans le milieu de culture.

C. Etudes du comportement des cellules HOP et HBMSC vis-à-vis d'apatites biomimétiques avec ou sans molécules de tiludronate

L'étude menée sur l'interface entre les biomatériaux à base d'apatites biomimétiques et les cellules HOP et HBMSC résulte d'une collaboration avec l'équipe de recherche dirigée par Joëlle Amédée, *INSERM U1026, Bioingénierie Tissulaire, Université de Bordeaux Segalen, Bordeaux, France*, développant des travaux portant sur l'ingénierie du tissu osseux et notamment sur l'étude de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines au contact de matériaux modifiés ou non.

Nos travaux ont été financés par un appel à projet : AAP CNRS 2009 « *Longévité et vieillissement* ». Dans le cadre de ce projet, un déplacement à Bordeaux a été effectué pour permettre l'observation, l'initiation à la biologie et à la manipulation en vue d'une meilleure compréhension et interprétation du comportement des cellules et des matériaux. Les tests cellulaires ont été scindés en trois expérimentations. Lors de la première expérimentation, nous avons étudié le comportement des matériaux vis-à-vis du milieu de culture et la prolifération des cellules sur les supports apatitiques. Durant la seconde expérimentation, les résultats de la prolifération cellulaire ont été confirmés et des techniques de biologie moléculaire ont été initiées pour analyser le phénotype et la fonction de ces cellules. La dernière expérimentation a été focalisée sur la biologie moléculaire et les expériences de zymographie pour étudier l'activité des MMPs. Cette dernière expérimentation n'ayant pas donné de résultats concluants, nous ne l'exposerons pas dans ce rapport.

Au contact du biomatériau, les ostéoblastes vont être sujets à une succession d'activités. Ainsi, les cellules colonisent d'abord le matériau, une migration des cellules est ensuite observée suivie d'une adhésion et prolifération à la surface du matériau. Ensuite, la phase de différenciation ostéoblastique commence suivie de l'étape de minéralisation du matériau. Ce sont ces différents processus qui vont être étudiés dans cette partie. Certains facteurs vont influencer l'adhésion, la prolifération ou la différenciation ostéoblastique et ainsi favoriser ou non la réponse des cellules vis-à-vis du biomatériau. Les travaux menés par Autefage *et al.* ont mis en évidence le rôle de la composition chimique, de la topographie de surface, de la taille des cristallites et de l'énergie de surface du biomatériaux en tant que

facteurs influant les fonctions ostéoblastiques [Autefage 2009 b]. Dans notre cas, nous porterons notre attention sur l'influence de la nature du NCA et l'effet des BPs sur la réponse cellulaire des cellules mésenchymateuses humaines indifférenciées (HBMSC) ou sur des cellules ostéoprogénitrices humaines (HOP) déjà engagées vers la voie ostéoblastique.

Le but de notre étude et de cette collaboration est donc d'évaluer l'adhésion, la prolifération et la morphologie de ces deux types cellulaires et d'évaluer leur capacité à se différencier en ostéoblastes matures après leur ensemencement sur des apatites nanocristallines biomimétiques NCA1 et NCA2 sous forme de pastilles. Cette étude nous permettra dans un premier temps de vérifier la biocompatibilité et la non-cytotoxicité de nos matériaux, dans un second temps d'étudier l'influence de la nature du modèle osseux sur l'adhésion et la prolifération cellulaire et de connaître la faculté du BP adsorbé à induire ou affecter la différenciation ostéoblastique.

I. Matériaux et méthodes

I. 1. Matériaux

Les supports apatitiques utilisés pour la culture cellulaire sont les pastilles élaborées selon le protocole précisé précédemment (voir paragraphe 1.2.1). Ces tests cellulaires ont nécessité la réalisation de plus d'une centaine de pastilles de chaque composition pour chaque campagne de tests.

I. 2. Culture cellulaire

I. 2. 1. Modèles cellulaires

Le choix de cellules utilisées pour l'ensemencement de nos matériaux s'est porté sur des cellules ostéoprogénitrices (HOP) et des cellules mésenchymateuses (HBMSC), cellules issues de la moelle osseuse humaine car elles constituent un modèle de choix pour l'étude de la différenciation ostéoblastique en réponse à un biomatériau. Ainsi, à partir d'un même prélèvement de moelle, une partie des cellules est orientée vers le lignage ostéoblastique par l'addition de dexaméthasone pendant 2 semaines afin d'obtenir les HOP (ostéoprogéniteurs) et l'autre partie est cultivée dans un milieu sans acide ascorbique en vue de l'obtention de cellules mésenchymateuses non différenciées capables de se différencier à tout moment suivant l'orientation envisagée par l'addition de facteurs spécifiques.

Les cellules HBMSC (*Human Bone Marrow Stroma Cells*), cellules mésenchymateuses humaines, ont été sélectionnées pour cette étude car ces cellules pluripotentes ont à plusieurs

reprises prouvé leur capacité à se différencier en ostéoblastes lors de leur culture au contact d'hydroxyapatite [Lin *et al.* 2009]. De plus, ces cellules présentent un intérêt supplémentaire par rapport aux HOP de part leur non différenciation.

1.2.2. Origine et obtention des cellules

Dans ce travail, nous avons utilisé des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir du stroma de la moelle osseuse humaine (HBMSCs pour Human Bone Marrow Stoma Cells). Les prélèvements de moelle osseuse sont effectués dans le service d'orthopédie du Professeur Fabre (CHU Pellegrin, Bordeaux) à partir de la diaphyse fémorale de patients âgés de 20 à 80 ans. Les cellules ostéoprogénitrices sont isolées à partir de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (appelées HOP pour Human OsteoProgenitors) suivant la technique développée au laboratoire *Biotis* de Bordeaux depuis de nombreuses années [Vilamitjana-Amedee *et al.* 1993]. L'isolement de ces cellules est précisé en annexe.

1.2.3. Conditions de culture

Les pastilles ont été placées sur une couche d'agarose (2% (p/v)), obtenue en dissolvant l'agarose dans une solution tampon saline de 0,1M de phosphate (PBS) à pH 7.4 pour empêcher l'adhésion des cellules dans les puits de culture en plastique. Les pastilles sont ensuiteensemencées à raison de 50000 cellules/cm² en présence de 2mL d'IMDM pour les HOP ou de 2mL d' α -MEM pour les HBMSC avec un supplément de 10%(v/v) de sérum de veau fœtal (FCS) et incubées à 37°C dans une atmosphère humide contrôlée à 5% de CO₂ pendant 21 jours. Le changement des milieux a lieu deux fois par semaine. Le témoin utilisé pour la prolifération cellulaire est le fond du puits de culture. La figure 3-19 schématise ces conditions de culture.

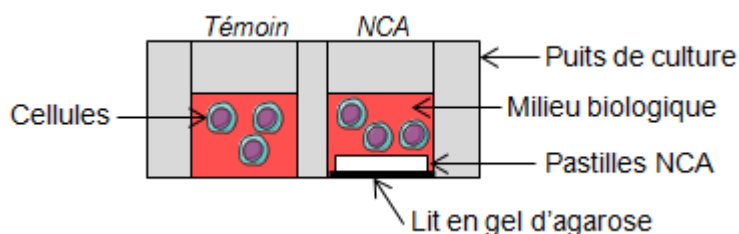


Figure 3-19:
Représentation schématique des conditions de culture : cas du puits « témoin » et cas du puits contenant un des matériaux à analyser

Pour chacune des campagnes de tests, les pastilles d'une même composition ont été réparties dans les puits de culture et attribuées pour les différentes évaluations cellulaires, comme suit (tableau 3-4):

	J1	J3	J7	J14	J21	Nombre de pastilles
Coloration au Live/Dead (1 pastille/puits) Observations au MEB	1	1	1	1	1	5
Test au MTT (1 pastille/puits)	4	4	4	4	4	20
Rouge d'alizarine (1 pastille/puits)	1	1	1	1	1	5
ARN (8 pastilles/puits)		2			2	32
Nombre total de pastilles pour chaque NCA et pour chaque type cellulaire						62
Nombre de pastilles de même composition pour l'intégralité d'une campagne de tests						124

Tableau 3-4: Plan d'expérience des tests avec les cellules HOP et HBMSC

1.2.4. Evaluation cellulaire de la viabilité, de la prolifération, de la différenciation et de la morphologie cellulaire

1.2.4.a. Coloration au Live/Dead

La viabilité des cellules a été déterminée à l'aide d'un kit viabilité/cytotoxicité Live/Dead Assay (Molecular Probes, *Invitrogen*) selon le protocole conseillé par le fabricant. Cette technique permet de contrôler la viabilité des cellules en culture. Elle est particulièrement intéressante pour observer le recouvrement cellulaire d'un matériau. Cette technique permet d'observer la présence de cellules vivantes et de cellules mortes dans une même culture. La distinction entre les cellules mortes (fluorescence rouge) et les cellules vivantes (fluorescence verte) a lieu par observation des cellules à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les détails de cette coloration sont exposés en annexe.

1.2.4.b. Test au MTT

La prolifération cellulaire a été réalisée selon la technique de Mosmann [Mosmann 1983]. Le contrôle positif ou témoin utilisé pour la prolifération cellulaire est le fond du puits. L'activité métabolique des cellules, c'est à dire leur adhésion et leur prolifération, a été suivie par coloration au MTT après 1 jour, 3 jours, 7 jours, 15 jours et 21 jours de culture. Le MTT ou Bromure de 3-(4-5 diméthylthiasol-2-yl) diphényl Tétrazolium (Sigma) est un sel de tétrazolium de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est réduit en cristaux bleus de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. La quantité de formazan générée par les cellules après leur incubation en présence des extraits de

matériaux est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules vivantes. Le mode opératoire est présenté en annexe. Les résultats seront exprimés en pourcentage par rapport au témoin qui représente le 100% d'activité métabolique, proportionnel au nombre de cellules vivantes.

1. 2. 4. c. Coloration au rouge d'alizarine

La différenciation ostéoblastique des cellules a été effectuée par coloration au rouge d'alizarine. Cette technique consiste à déterminer la capacité des cellules à former une matrice minérale détectable au rouge d'alizarine [Martin 2009] et repérée par une coloration foncée.

1. 2. 4. d. Observations par microscope électronique à balayage

Des observations par microscope électronique à balayage de la surface des pastilles après 21 jours de culture ont permis de visualiser à la fois la morphologie des cellules fixées en surface et la formation de la couche cellulaire. Les observations ont été réalisées à l'INSERM U1026 de Bordeaux à l'aide d'un MEB Hitachi S-2500 équipé d'un filament LaB6 sur les échantillons préalablement métallisés à l'or.

1. 2. 5. Analyse de l'expression des gènes

1. 2. 5. a. Notions de biologie

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est une molécule, présente dans toutes les cellules vivantes, qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement de l'organisme. L'ADN détermine la synthèse des protéines par l'intermédiaire de l'ARN (acide ribonucléique) dont le processus est schématisé en figure 3-20. L'information génétique contenue au sein de l'ADN n'est pas utilisée directement par la cellule pour fabriquer des protéines. Celle-ci utilise pour cela des copies transitoires de l'information génétique que sont les ARN messagers, notée ARNm. Chaque ARN messenger comporte les instructions pour former une seule protéine et correspond à la copie d'un seul des gènes du génome. L'ARNm ne contient la copie que du brin codant de l'ADN. L'ARNm synthétisé dans le noyau de la cellule est exporté dans le cytoplasme pour être traduit en protéine. Le besoin cellulaire en telle ou telle protéine peut varier en fonction de l'environnement, du type de cellule, du stade de développement. La synthèse protéique doit donc être activée ou arrêtée en fonction des conditions cellulaires. La régulation de la transcription de l'ADN en l'ARNm répond à une nécessité et est contrôlée par des facteurs de

transcription spécifiques répondant à un signal biologique et régulant l'expression des gènes. C'est donc l'ARN que nous allons isoler et étudier.

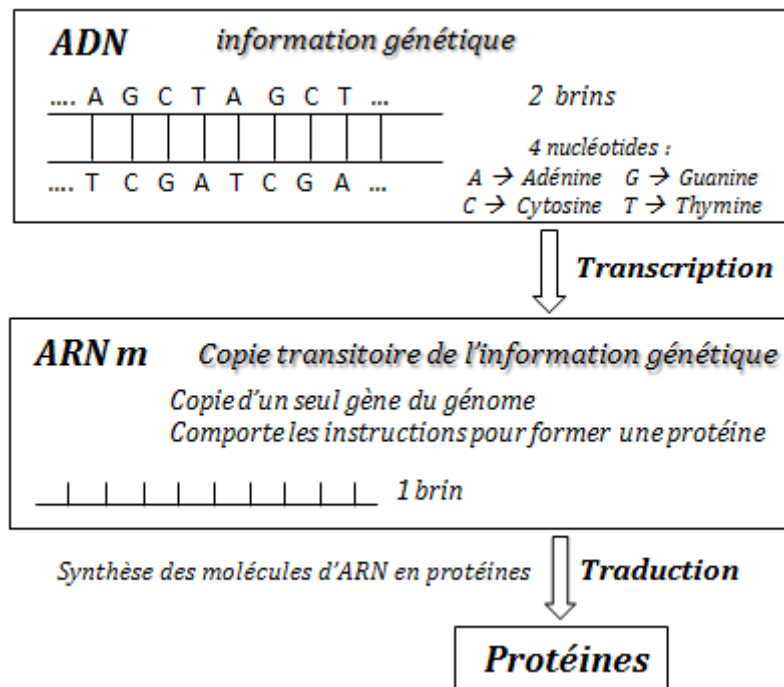


Figure 3-20: Représentation schématique de l'évolution de l'ADN en protéines par le biais des ARNm

Les différentes étapes du processus de test ARN sont les suivantes :

- Mise en contact des cellules HOP et HBMSC avec le biomatériau
- Collecte des cellules à différents temps de culture (J1, J3, J7, J14, J21)
- Extraction de l'ARN
- Contrôle qualité : Electrophorèse en gel d'agarose
- Transcription inverse (*Reverse Transcription, RT*)
- PCR Quantitative en temps réel (*Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR*)

1. 2. 5. b. Isolement de l'ARN

Le protocole de préparation des puits cellulaires pour l'isolement des ARN est présent en annexe. Les tests ARN sont réalisés après 1 jour (J1), 3 jours (J3), 7 jours (J7), 14 jours (J14) et 21 jours (J21) d'incubation. La méthode d'extraction de l'ARN total (ARNt) utilisée est « la purification de l'ARN sur colonne d'affinité » dont le détail est présenté en annexe.

Afin d'évaluer la pureté et de quantifier l'ARNt un dosage spectrophotométrique est effectué, et pour observer la qualité des ARN une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée, ces deux contrôles sont indispensables

1. 2. 5. c. Contrôles qualité

➤ Dosage spectrophotométrique

Une mesure de l'absorbance des différents puits (témoins, NCA1, NCA2, NCA1+BP et NCA2+BP) aux différents temps de culture (J1, J3, J7, J14 et J21) est réalisée. Le dosage a lieu à deux longueurs d'onde différentes : $\lambda=260$ nm et 280 nm correspondant respectivement à l'absorbance de l'ARN et des protéines. Le ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} fournit une estimation de la contamination protéique et permet donc de vérifier si l'ARN a été purifiée correctement ($1,8 < DO_{260nm}/DO_{280nm} < 2,0$).

➤ Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode utilisée en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques (ADN, ARN) chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice de gel d'agarose (gel à 0,8% d'agarose).

Dans notre cas, cette méthode sert à démontrer l'intégrité des ARN en visualisant sur gel d'agarose coloré au BET (bromure d'ethyidium), les ARN ribosomiques 28S et 18S. Cette étape est importante pour la fiabilité des résultats à venir en QPCR.

1. 2. 5. d. Transcription inverse (RT)

La transcription est un processus biologique ubiquitaire qui consiste, au niveau de la cellule, en la copie des régions dites codantes de l'ADN en molécules d'ARN (figure 3-20). L'enzyme qui catalyse cette réaction de transcription est appelée ARN polymérase. La transcription inverse (en anglais *reverse transcription* ou RT) est une enzyme qui transcrit l'information génétique de l'ARN en ADN complémentaire, notée ADN-c [Bagory 2006]. La synthèse de l'ADN-c à partir des ARN totaux est détaillée en annexe.

1. 2. 5. e. PCR Quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR classique consiste en une répllication à la chaîne d'une séquence d'ADN par des enzymes, les Taq polymérases [Bagory 2006]. Le ADN-c obtenu par la transcription inverse (RT) permet d'effectuer la PCR. Les différentes étapes de la PCR sont détaillées en annexe.

La PCR quantitative en temps réel est la méthode de choix, utilisée pour quantifier l'expression des ARN messagers d'intérêt, qui sont souvent peu exprimés. Le principe de la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule fluorescente capable d'émettre dans des conditions bien définies un rayonnement fluorescent dont l'intensité sera directement mesurée à un instant donné au cours de chaque cycle PCR [Giulietti *et al.* 2001]. L'intensité de la fluorescence émise par la molécule augmente à chaque cycle PCR. Le système de détection le plus simple repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le SYBR green I (MesaGreen Eurogentec) qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. Les détails sont énoncés en annexe.

Cette méthode n'est applicable que lorsque les rendements de PCR des gènes comparés sont semblables. Le gène choisi comme référence est le gène endogène d'une protéine ribosomique : Po. L'expression de quatre gènes, marqueurs ostéoclastiques, a été étudiée : Oc, Cbfa1, Pal, MMP1 et MMP13. MMP13 joue un rôle particulier dans la dégradation du cartilage et MMP1 dégrade le collagène interstitiel. Le gène Pal est phosphatase alcaline aussi appelé ALP. Le rôle des gènes : ostéocalcine (Oc), Cbfa et phosphatase alcaline (Pal ou ALP) ont été préalablement précisé en I.1 de ce chapitre.

II. Résultats

II. 1. Essais préliminaires

En préambule de l'étape d'ensemencement des matériaux, une étape de « pré-incubation » des matériaux dans le milieu acellulaire pendant un jour a été réalisée afin de simuler les conditions générales de culture cellulaire et d'appréhender les éventuels problèmes liés à l'exposition des matériaux. Lors de cette étape de « pré-incubation », soit lors du premier jour de mise en contact des pastilles avec le milieu de culture acellulaire, les biologistes nous ont fait part d'une acidification du milieu observée grâce au changement de couleur du milieu (passant de rouge à jaune-orangé). Cette acidification a été relevée sur tous les puits contenant les matériaux aussi bien NCA que NCA+BP avec un jaunissement plus prononcé pour NCA et plus particulièrement NCA1. Toutefois, notons qu'une fois le milieu de culture renouvelé, aucune autre acidification n'a été observée sur les milieux ultérieurs.

Suite aux constatations de nos collègues biologistes, nous avons donc réalisé une étude afin d'évaluer le comportement *in vitro* des pastilles à l'aide d'un montage modélisant de façon plus simple les conditions de culture par le biais d'une immersion du matériau dans le milieu de culture utilisé lors des tests *in vitro* (IMDM Glutamax, *Invitrogen Gibco*) exempt de cellules. Bien que simplifié ce modèle permet de visualiser les possibles réactions intervenant lors de l'exposition du matériau.

II. 1. 1. Cinétiques de pH

II. 1. 1. a. Mode opératoire

Un montage mis en place afin de réaliser des cinétiques de pH et de connaître de façon plus précise l'évolution du pH *in situ* dans le puits de culture lors de l'exposition des pastilles est présenté en figure 3-21.

Une pastille de NCA est immergée dans un tube contenant un volume de 3mL de milieu de culture (IMDM Glutamax, *Invitrogen*) afin de se rapprocher des conditions expérimentales des tests de culture. Ce tube hermétique est placé dans un bécher à double paroi relié à un bain thermostaté réglé à 37°C, comme décrit sur la figure 3-21. Un pH-mètre, relié à un enregistreur, mesure en continu le pH de la solution. L'expérience a été répétée trois fois et dure jusqu'à 72h soit 3 jours, durée au bout de laquelle le milieu de culture est renouvelé lors des tests *in-vitro*. Des expériences supplémentaires ont été arrêtées à différents temps : 3 heures, 8 heures, 1 jour et 2 jours afin d'évaluer l'évolution de la teneur en ions calcium et phosphore dans le milieu par analyse ICP-AES de celui-ci et l'évolution du support par

analyse spectroscopique FTIR (annexes). Notons que cette expérience a aussi été réalisée également sur les pastilles NCA3, bien qu'elles ne soient pas soumises aux tests *in vitro*, afin d'étudier l'impact de la carbonatation et l'évolution d'un modèle osseux différent de NCA1 et NCA2.

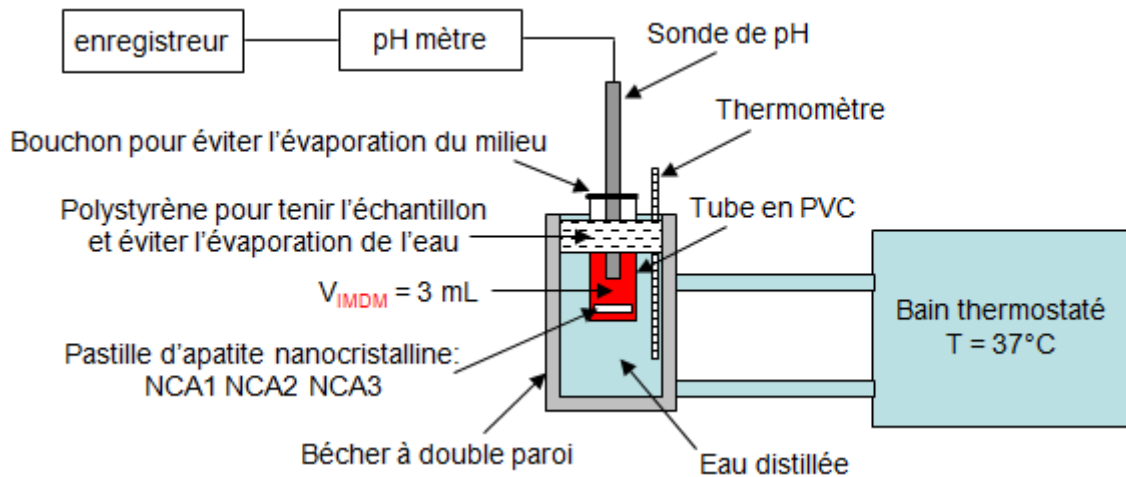


Figure 3-21: Montage de l'expérience de cinétique de pH

Ce montage permet ainsi de minimiser l'évaporation du milieu tout au long de la mesure de pH, et de palier à un phénomène de pollution du CO₂ puisque le pH-mètre n'est manipulé que lors de la mise en route et de l'arrêt. Notons qu'aucun bactéricide de type azoture n'a été placé dans les tubes.

II. 1. 1. b. Résultats

Les cinétiques de pH obtenues lors de la mise en contact des pastilles de NCA1, NCA2 et NCA3 avec le milieu acellulaire (IMDM Glutamax, *Invitrogen*) sont reportées en figure 3-22. La figure 3-22 regroupe à la fois le tracé de la cinétique de pH et les écart-types de mesures de quelques points correspondants.

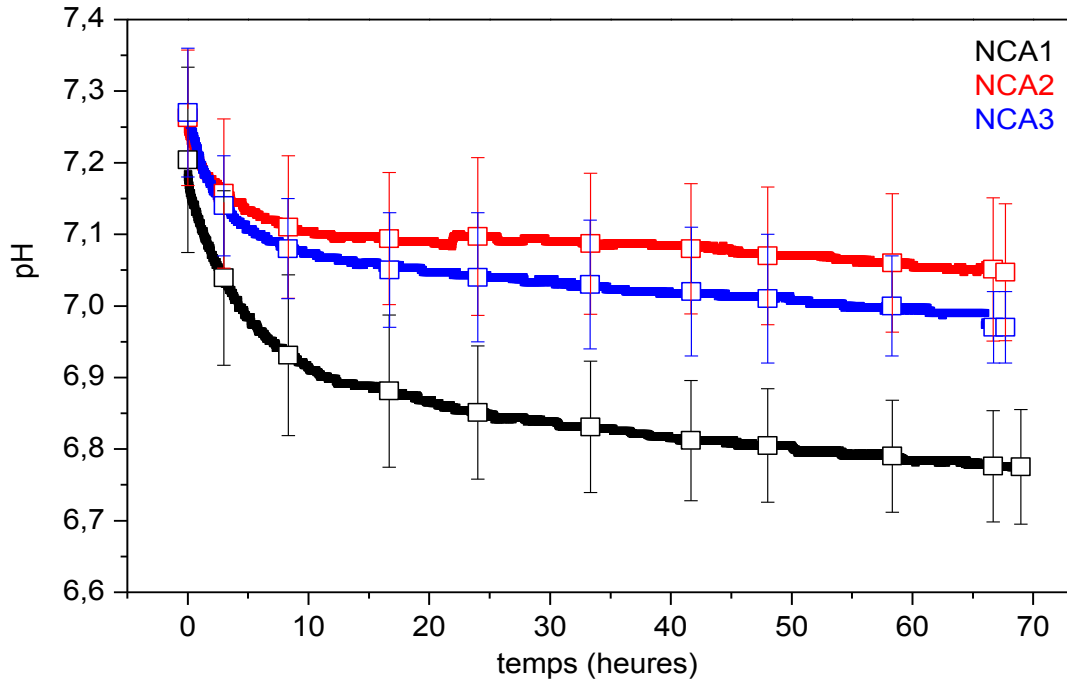


Figure 3-22: Cinétiques de pH des pastilles NCA1, NCA2 et NCA3 en contact avec le milieu de culture selon le mode opératoire (figure 3-21)

Une diminution du pH est constatée quelle que soit la nature du support bien qu'elle soit plus importante dans le cas de NCA1 en accord avec les observations des biologistes. Notons que la variation de pH engendrée par les apatites nanocristallines diminue avec le temps. Cependant, dans ce milieu de culture, l'évolution reste modérée jusqu'à une durée de 72 heures, soit la période correspondant à l'intervalle de renouvellement du milieu selon le mode opératoire employé lors des tests en présence de HOP et HBMSC.

Un tel phénomène a déjà été observé par Gustavsson *et al.* lors de la pré-incubation de pastilles d'apatites synthétisées par hydrolyse de α -TCP dans différents milieux aqueux complexes utilisés lors de culture cellulaire (DMEM et McCoy 5A modifié) [Gustavsson *et al.* 2011].

Ces évolutions du pH sont également associées à une variation de la composition des ions en solution.

II. 1. 2. Dosage des ions calcium et phosphore en solution

Le dosage des ions calcium et phosphore en solution a été réalisé au bout de différents temps d'incubation (3 heures, 8 heures, 1 jour, 2 jours et 3 jours) et pour chacun des composés synthétisés (NCA1, NCA2 et NCA3) par analyse ICP-AES. Cette étude permet de vérifier l'existence d'éventuelles réactions d'échanges ioniques entre les apatites phosphocalciques nanocristallines biomimétiques synthétisées, par le biais des ions labiles de la couche

hydratée, et les ions présents dans le milieu complexe que constitue l'IMDM Glutamax (*Invitrogen*). La figure 3-23 montre l'évolution de la concentration en ions calcium et phosphate présents dans le milieu de culture tout au long de l'expérience. A titre d'indication, la teneur initiale en ions calcium et phosphore du milieu de culture initial a été reportée sur les figures 3-23 A et B sous la dénomination « milieu pur ».

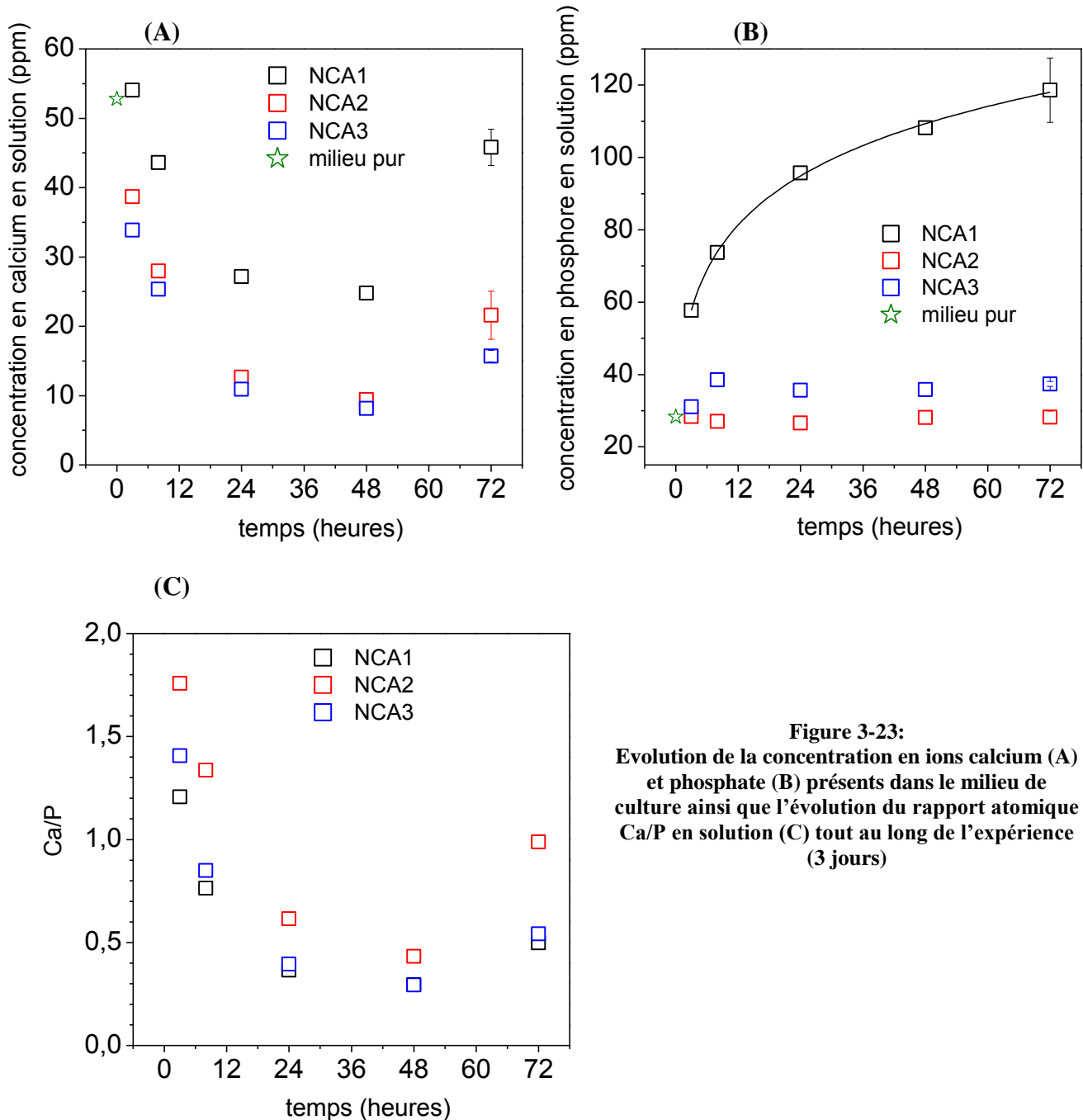


Figure 3-23:
Evolution de la concentration en ions calcium (A) et phosphate (B) présents dans le milieu de culture ainsi que l'évolution du rapport atomique Ca/P en solution (C) tout au long de l'expérience (3 jours)

D'après la figure 3-23 A, la teneur en ions calcium diminue durant les deux premiers jours de culture puis augmente après 2 jours de culture quelle que soit la nature de NCA. On peut

remarquer que l'évolution des supports maturés 31 jours : NCA2 et NCA3 est comparable. La teneur en phosphore montre peu de variation pour NCA2 et NCA3, et paraît légèrement inférieure pour l'apatite carbonatée NCA2. En ce qui concerne NCA1, support non maturé et non carbonaté, on observe une diminution moindre de la concentration des ions calcium et une augmentation relativement importante des ions phosphate. Globalement pour les trois supports, le rapport Ca/P en solution diminue jusqu'à 48h puis augmente ensuite (figure 3-23 C). Remarquons que les valeurs de Ca/P obtenus après 8h sont très inférieures à celles des solides de départ.

II. 1. 3. Evolution des supports

Une attention a aussi été donnée au matériau lors des cinétiques de pH et à l'évolution des apatites nanocristallines lors de leur immersion puisque Rey *et al.* ont mis en évidence la faculté des apatites nanocristallines à évoluer vers une structure cristalline plus stœchiométrique lors de leur immersion en milieu aqueux [Rey *et al.* 2007 b].

II. 1. 3. a. Mode opératoire

Les pastilles ont été prélevées après différents temps d'exposition dans le milieu de culture (IMDM) exempt de cellules (3h, 8h, 1j, 2j ou 3j). Elles sont ensuite rincées abondamment avec de l'eau distillée afin d'enlever la pellicule de milieu restée en surface de la pastille lors de son extraction. Puis, elles sont placées dans une étuve pendant quelques minutes afin d'être séchées.

Les analyses spectroscopiques FTIR ont lieu sur des pastilles élaborées à partir d'une partie de la pastille exposée. Ensuite, un traitement mathématique de décomposition à l'aide du logiciel *Grams/386, Galactica* a été réalisé sur les bandes $\nu_4\text{PO}_4$ et $\nu_2\text{PO}_4$, selon la méthode de Rey *et al.* afin de déterminer de façon semi-quantitative l'évolution des supports liée à leur immersion dans le milieu.

II. 1. 3. b. Résultats

La figure 3-24 présente l'évolution des bandes d'absorption ν_4 et ν_2 des groupements phosphate des pastilles brutes (pastilles non immergées dans le milieu servant de référence) et des pastilles après différents temps d'immersion dans le milieu de culture biologique exempt de cellules : 3 heures (3h), 8 heures (8h), 1jour (1j) 2jours (2j) et 3jours (3j) obtenue par le traitement mathématique.

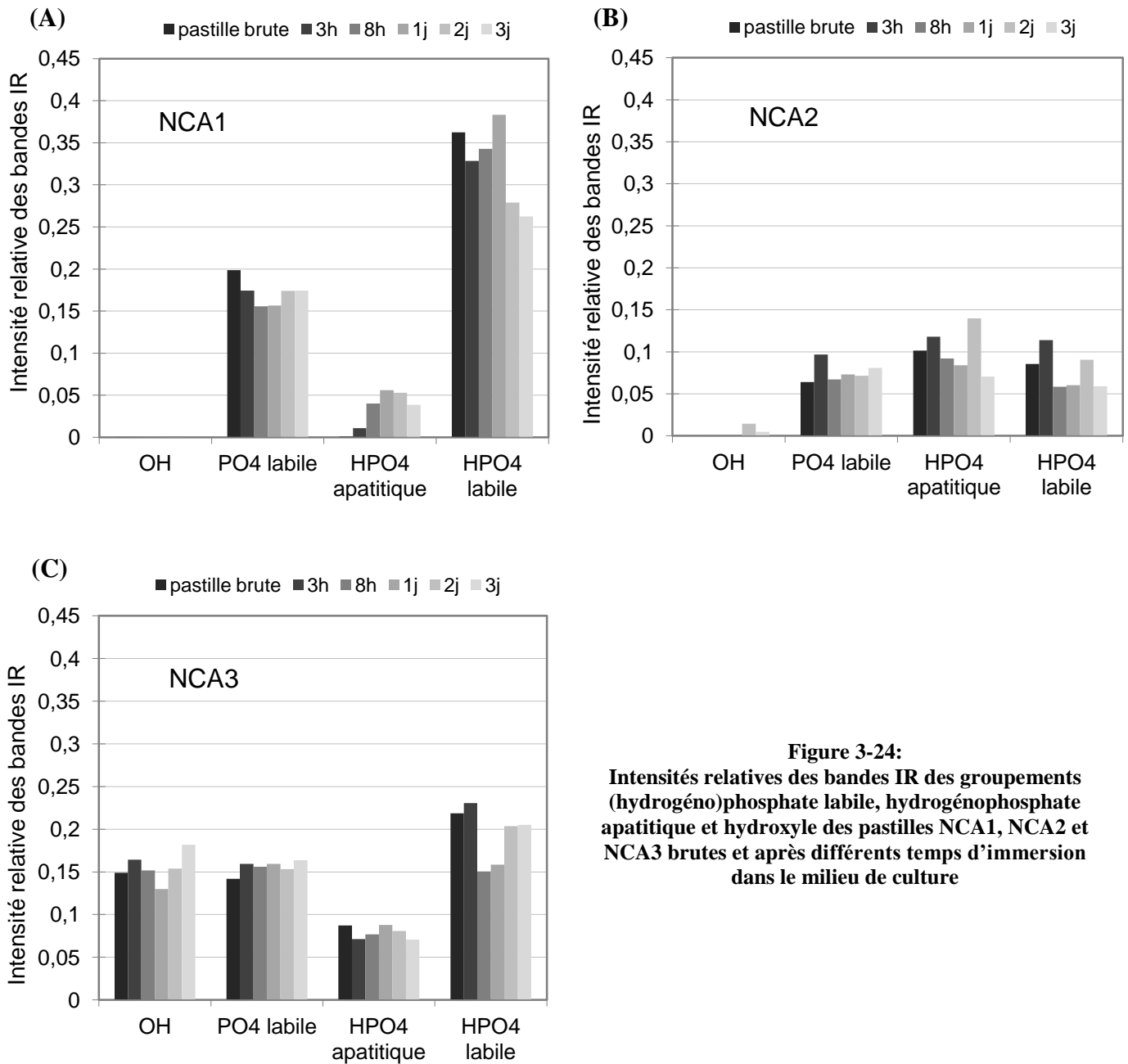


Figure 3-24:
Intensités relatives des bandes IR des groupements (hydrogène)phosphate labile, hydrogénophosphate apatitique et hydroxyle des pastilles NCA1, NCA2 et NCA3 brutes et après différents temps d'immersion dans le milieu de culture

L'évolution des apatites est plus significative pour l'apatite NCA1, non maturée non carbonatée, où l'on note une diminution des HPO₄ labile pour les temps de séjour élevés en accord avec le phénomène de maturation décrit en chapitre 2 tandis que l'évolution des autres supports reste plus modérée.

Une carbonatation des supports et plus particulièrement de l'apatite NCA1 est observée au cours de l'immersion dans le milieu de culture exempt de cellule, signe de l'évolution de cette apatite dans le milieu de culture.

Cependant, on n'observe pas dans ce milieu de variations importantes de la proportion d'ions OH^- et les spectres ne semblent pas montrer de variations significatives pour la durée considérée. Si ce résultat était attendu pour les apatites maturées, il est plus surprenant pour les apatites NCA1 puisque leur remise en solution devrait s'accompagner d'une accélération des phénomènes liés à la maturation [Vandecandelaere 2012]. Parmi les phénomènes susceptibles de limiter l'évolution des pastilles NCA1, en principe très réactives, on peut envisager l'échange de surface avec les ions magnésium, qui existent en concentration relativement importante dans le milieu et qui sont des inhibiteurs de la croissance cristalline des apatites et stabilisent la couche hydratée. Nous n'avons cependant pas pu vérifier cette hypothèse. Une deuxième explication serait qu'une grande partie de la surface minérale des nanocristaux reste inaccessible dans les pastilles malgré une percolation de l'eau et que les variations attendues ne toucheraient qu'une faible partie des nanocristaux au contact de la solution et produiraient par conséquent des modifications non détectables par spectroscopie IR sur l'ensemble de la pastille. On peut remarquer en soutien de cette hypothèse que la teneur en HPO_4 labile semble diminuer à 3 jours, comme on pouvait s'y attendre, peut être en relation avec une proportion plus importante de nanocristaux affectés après ce temps d'immersion et de réhydratation relativement important.

II. 1. 4. Discussions

Plusieurs phénomènes peuvent contribuer à l'évolution de la composition des solutions :

- Dissolution des supports apatitiques
- Précipitation de phosphate de calcium dans le milieu de culture sursaturé par rapport à différents sels de calcium
- Modification de surface des apatites (réaction d'échanges, équilibre de surface)
- Maturation des supports constitués d'apatites nanocristallines

En préambule remarquons que le fort rapport solide/solution dans la solution amplifie les phénomènes de surface et que les variations observées en solution n'affectent pas nécessairement de manière visible le support. Ainsi on peut calculer que les variations maximales des teneurs en ions minéraux observées en solution ne représentent qu'une infime proportion de la quantité de ces ions présents dans les pastilles (au maximum quelques pourcents). L'examen des résultats obtenus montre clairement qu'il existe deux types d'évolution : une évolution correspondant aux apatites maturées (NCA2 et NCA3) et une évolution correspondant à l'apatite non maturée (NCA1).

Les phénomènes de dissolution et de précipitation sont déterminés par le produit de solubilité de l'apatite du support (K_s) et le produit ionique dans la solution de culture (Q_s) selon la formule de l'indice de saturation :

$$\text{Indice Saturation} = \log\left(\frac{Q_s}{K_s}\right)$$

- Si $Q_s < K_s$ (*Indice Saturation* < 0) : il y a **dissolution** des supports apatitiques
- Si $Q_s > K_s$ (*Indice Saturation* > 0) : il y a **précipitation** de phosphate de calcium dans le milieu de culture sursaturé par rapport à différents sels de calcium
- Si $Q_s = K_s$, il y a équilibre du minéral avec la solution

Cependant, le produit de solubilité des apatites nanocristallines ne peut être clairement défini et plusieurs travaux ont montré qu'il existait pour ces composés un équilibre de solubilité métastable : MES (*Metastable Equilibrium Solubility*) [Fox *et al.* 1995; Baig *et al.* 1999] qui dépend de l'état de maturation et la composition des apatites nanocristallines et qui varie suivant le pourcentage de solide dissous. Cette approche permettant de décrire l'équilibre solide-solution dans le cas des apatites NCA est illustrée sous forme de profil MES par les auteurs (figure 3-25).

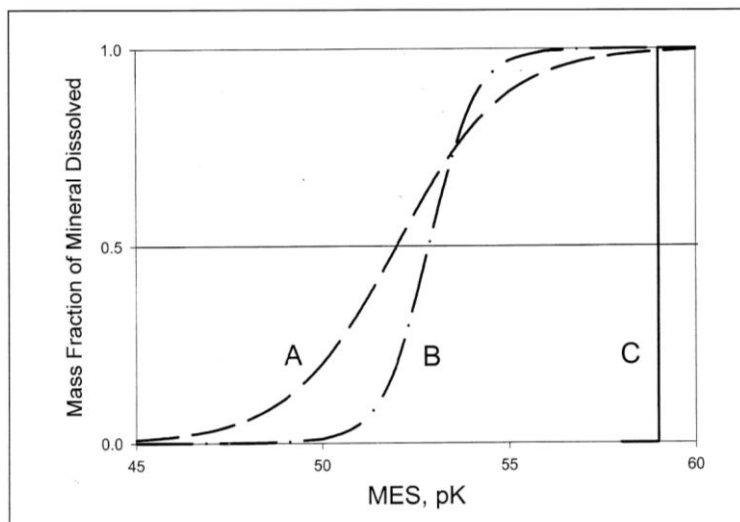


Figure 3-25:
Illustration schématique de trois profils MES [Chow *et al.* 2001]

*Le composé A est en moyenne plus soluble que le composé B et la solubilité de A couvre un large domaine. C ne présentant qu'une seule valeur de MES s'apparente au K_s conventionnel [Chow *et al.* 2001].*

Connaissant la composition du milieu de culture cellulaire (annexe) ainsi que le pH, la température et les concentrations en ions calcium et phosphate en solution pour des temps donnés (tableau 3-5), nous avons calculé l'indice de saturation pour un temps de culture de 2 jours et 3 jours à l'aide du logiciel *Visual MINTEQ* afin d'essayer de déterminer la nature des réactions gouvernées par la solubilité de NCA1, NCA2 et NCA3.

	à t = 3h			à t = 48h			à t = 72h		
	pH	Ca (mM)	P (mM)	pH	Ca (mM)	P (mM)	pH	Ca (mM)	P (mM)
NCA1	7,04	1,35	1,87	6,81	0,62	3,49	6,78	1,14	3,83
NCA2	7,16	0,97	0,92	7,07	0,23	0,91	7,05	0,54	0,91
NCA3	7,14	0,85	1,00	7,01	0,20	1,16	6,97	0,39	1,21

Tableau 3-5: Valeurs du pH et des concentrations en ions calcium et phosphate après 2 jours et 3 jours d'immersion des pastilles NCA1, NCA2 et NCA3 dans le milieu de culture cellulaire

Le tableau 3-6 recense les valeurs d'indices de saturation obtenues par rapport à l'hydroxyapatite après 2 jours et 3 jours d'immersion des pastilles NCA1, NCA2 et NCA3 dans le milieu de culture.

<i>Indice de saturation par rapport à l' Hydroxyapatite</i>	NCA1	NCA2	NCA3
à t = 3h	7,8	6,8	6,5
à t = 48h	5,7	3,3	3,1
à t = 72h	7,0	5,0	4,3

Tableau 3-6: Indices de saturation obtenus par rapport à l'hydroxyapatite après 48h et 72h d'immersion des pastilles NCA1, NCA2 et NCA3 dans le milieu de culture

L'indice de saturation pour l'hydroxyapatite dans le milieu de culture initial est de 9,0. Les valeurs des indices de saturation sont positives dans tous les cas étudiés, mais, il est difficile de déterminer si un équilibre de dissolution est atteint. On remarque cependant que pour les apatites mûrées : NCA2 et NCA3, l'indice de sursaturation est toujours inférieur à celui de NCA1.

Dans tous les cas, les apatites nanocristallines sont généralement beaucoup plus solubles que l'hydroxyapatite stœchiométrique. Toutefois, considérant la complexité de ce système, notre interprétation restera qualitative.

Dans le cas de NCA2 et NCA3, on observe que la concentration en phosphate dans la solution reste quasiment constante alors que la concentration en calcium et le pH diminuent au cours du temps, les premières 48 heures. Ces phénomènes ont été observés par Gustavsson *et al.* [Gustavsson *et al.* 2011] et ont été interprétés en terme de réactivité de surface : le calcium s'adsorberait à la surface des nanocristaux et provoquerait une libération de protons dans la solution préservant l'électroneutralité du solide. Dans le cas de ces apatites mûrées, on peut effectivement penser que les phénomènes de surface prédominent par rapport à l'évolution des nanocristaux. Diverses études ont cependant montré que les réactions de surface sur ce

type d'apatite sont extrêmement rapides (quelques dizaines de minutes) [Cazalbou 2000; Drouet *et al.* 2008; Errassifi 2011] et on peut s'étonner que l'évolution de la solution soit observée sur plusieurs heures. Ce phénomène pourrait être attribué à la lente diffusion de la solution dans le cœur de nos pastilles nanoporeuses. La diminution du calcium en solution et du pH, alors que la concentration en ions phosphate varie peu, indique que la fixation de calcium en surface se traduit par une diminution du produit ionique en solution comme le montre le tableau 3-6, en supposant qu'un équilibre est atteint. Bien que ces apatites aient des comportements légèrement différents, il est difficile de les attribuer à une différence de composition (NCA2 carbonatée non hydroxylée et NCA3 non carbonatée hydroxylée), de surface spécifique ou de réactivité de surface.

En ce qui concerne NCA1, apatite nanocristalline non maturée et non carbonatée, l'évolution de la phase solide ne peut pas être négligée, la libération de phosphate, en particulier, traduit un phénomène d'évolution des nanocristaux au contact de la solution qui pourrait correspondre au développement des domaines apatitiques, constitués essentiellement d'ions PO_4^{3-} au dépend des ions présents dans la couche hydratée, constituée essentiellement d'ions HPO_4^{2-} et Ca^{2+} . Ce développement des domaines apatitiques conduit à plusieurs altérations de la composition de la couche hydratée et probablement de la solubilité associée à ces apatites. Tout d'abord, le rapport Ca/P des domaines apatitiques est supérieur à celui de la couche hydratée constituée essentiellement d'ions bivalents. Le développement des domaines apatitiques aux dépens de cette couche s'accompagne donc d'un enrichissement en ions phosphate et d'une diminution transitoire du rapport Ca/P de la couche hydratée (figure 3-26). Ce développement des domaines apatitiques est également associé à une libération de protons due à la conversion d'une majorité de groupements HPO_4^{2-} de la couche hydratée en ions PO_4^{3-} pour construire l'apatite. L'équilibre ultime entre la couche hydratée et la solution se traduit par la libération en solution d'une quantité de protons et phosphate beaucoup plus grande que pour les supports maturés lui permettant de rétablir un équilibre de composition avec la solution.

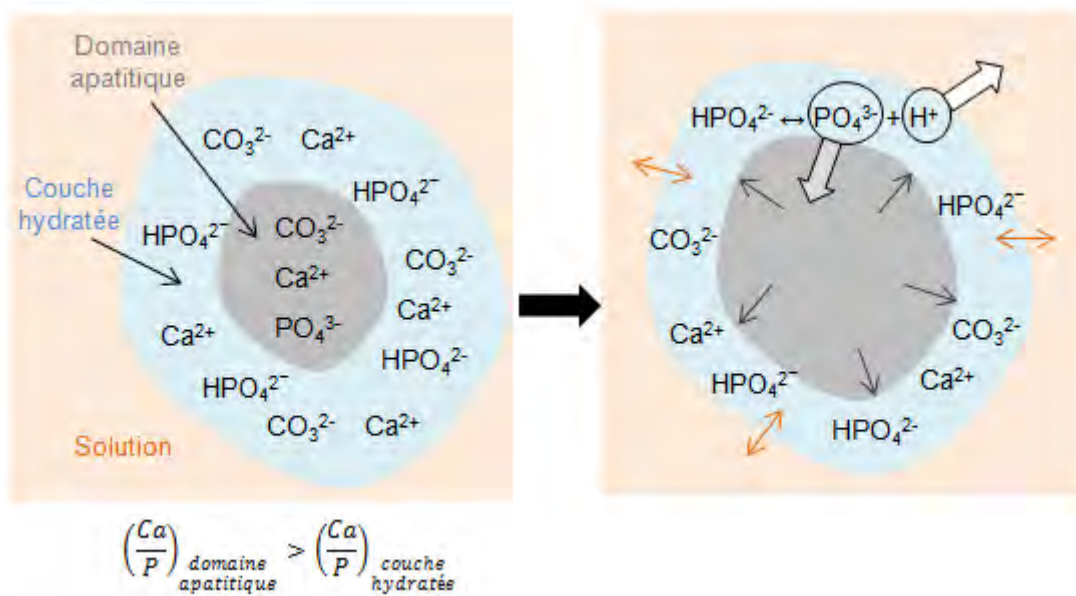


Figure 3-26: Représentation schématique du développement des domaines apatitiques

Quel que soit le type de support, une évolution est observée au delà de 48 heures : la teneur en calcium augmente nettement alors que la teneur en phosphate et en proton évolue peu dans les apatites maturées et augmente légèrement pour l'apatite non maturée. Ce phénomène a été vérifié sur plusieurs essais et est observé pour les trois types d'apatites nanocristallines. Il est à l'heure actuelle difficile de proposer une interprétation. Plusieurs phénomènes peuvent être envisagés, une augmentation de la force ionique due à la fuite de KCl de l'électrode dans le milieu de culture, un effet des ions carbonates de la solution s'incorporant au domaine apatitique, une pollution bactérienne, bien que celle-ci ne soit pas apparente. Dans le cas de l'apatite non maturée non carbonatée NCA1, cette évolution pourrait être liée au développement des domaines apatitiques comme nous l'avons expliqué précédemment, les modifications de la composition de la couche hydratée induite par ce développement pouvant se traduire par une évolution de la solubilité. Il est difficile cependant de retenir cette explication pour les apatites maturées bien que des travaux récents aient montré [Vandecandelaere 2012] que la réhydratation des apatites nanocristallines lyophilisées s'accompagne d'une accélération des phénomènes liés à la maturation notamment du développement des domaines apatitiques au détriment de la couche hydratée.

II. 2. Etude des réponses des cellules HOP et HBMSC vis-à-vis des apatites biomimétiques

Cette partie est focalisée sur le comportement des différents types de cellules : HOP et HBMSC vis-à-vis de nos matériaux : NCA1 et NCA2 ayant préalablement adsorbé ou non des molécules de tiludronate afin d'évaluer l'influence de la présence du BP et la nature des matériaux sur la réponse cellulaire.

II. 2. 1. Viabilité cellulaire

Les résultats du Live/Dead réalisés sur le témoin et les matériaux NCA1, NCA1+BP, NCA2, NCA2+BP après différents temps de culture (3 jours, 7 jours, 14 jours et 21 jours) avec les cellules HOP et HBMSC sont respectivement montrés en figures 3-27 et 3-28. La fluorescence verte des cellules est observée pour le témoin attestant de la viabilité des cellules tout au long des tests *in vitro*. Cette viabilité cellulaire est aussi constatée pour tous les matériaux tout au long des tests *in vitro* quel que soit le modèle cellulaire utilisé. Notons l'étalement des cellules sur les matériaux et la présence de filopodes⁴ sur les micrographies. Ces premiers résultats mettent donc en évidence l'absence de mort cellulaire à la fois pour les matériaux NCA et les matériaux NCA+BP à la concentration en BP utilisée.

Dans le cas des matériauxensemencés par des cellules HOP (figure 3-27), nous constatons que le nombre de cellules est plus important pour les matériaux contenant du BP (NCA1+BP et NCA2+BP) que pour les matériaux NCA exempts de BP (NCA1 et NCA2), quel que soit le temps, ce qui pourrait démontrer une influence positive du BP sur l'étalement cellulaire des HOP. De plus, nous remarquons des différences de cinétique entre NCA1+BP et NCA2+BP à J7 et J14 : la prolifération cellulaire semble plus importante sur le support NCA1+BP à J7 et J14, alors que le nombre de cellules semble similaire à J21. Toutefois, quel que soit le type de cellules, elles présentent un meilleur étalement sur NCA1+BP que sur NCA2+BP tandis qu'aucune différence significative n'est constatée entre NCA1 et NCA2. Ainsi, si nous pouvons au vue des ces observations en microscopie faire un classement préférentiel à J21, il pourrait être noté ainsi : $NCA1=NCA2 < NCA2+BP \leq NCA1+BP$.

Dans le cas des matériauxensemencés par des cellules HMSBC (figure 3-28), la même constatation est observée entre NCA1+BP et NCA2+BP et entre NCA1 et NCA2 et suit le même ordre quel que soit le temps : $NCA1=NCA2 < NCA2+BP < NCA1+BP$. Notons

⁴ Filopodes : Fins prolongements de la cellule permettant sa mobilité

l'étalement des cellules HBMSC par rapport à celui des cellules HOP atteste de l'évolution de ces cellules non différenciées.

La présence de BP stimule l'étalement cellulaire quelles que soient les cellules choisies, d'autant plus que le support est proche d'un os « jeune » non mature. Cette différence observée entre les deux supports peut être due à une différence de solubilité entre le support NCA1 plus soluble que NCA2 et donc susceptible de libérer plus rapidement en solution des ions capables d'agir sur l'étalement des cellules, comme les molécules de BP. Elle peut être due également à l'action du tiludronate sur les propriétés interfaciales des pastilles puisque la quantité adsorbée à saturation est plus importante pour le support NCA1 que NCA2.

II. 2. 2. Prolifération cellulaire

La figure 3-29 reporte l'évolution de la prolifération cellulaire obtenue suite aux tests au MTT effectués sur le témoin et les matériaux NCA1, NCA1+BP, NCA2, NCA2+BP après différents temps de contact (1 jour, 3 jours, 7 jours, 15 jours et 21 jours) avec les cellules HOP et HBMSC. Les résultats indiquent que les cellules HOP et HBMSC présentent une cinétique de prolifération cellulaire similaire quel que soit le type de matériaux. Ces analyses quantitatives mettent en évidence une activité métabolique plus importante pour les composés comprenant le tiludronate quelle que soit la nature des cellules. Au regard des tests MTT réalisés, nous pouvons dire que le tiludronate stimule la prolifération cellulaire des HOP et des HBMSC puisque l'effet du tiludronate est constaté tout au long de la culture cellulaire, du premier au dernier jour, pour les deux types de cellules choisis. Mais aucune différence n'est observée entre les supports NCA1 et NCA2 avec ou sans BP.

Ces résultats mettent donc en évidence l'action d'un bisphosphonate, le tiludronate, sur la prolifération des cellules indifférenciées telles que les HBMSC. Ces conclusions sont en accord avec de précédentes études menées démontrant l'action de diverses molécules de BPs associées à un composé phosphocalcique sur la prolifération de cellules capables de se différencier en ostéoblastes telles que la lignée de cellules ostéoblastiques : MG63 [Boanini *et al.* 2008; Panzavolta *et al.* 2009] et des cellules osseuse primaires trabéculaires humaines [Im *et al.* 2004]. Par contre la nature du modèle cellulaire ne semble pas avoir une influence sur la prolifération de ces cellules.

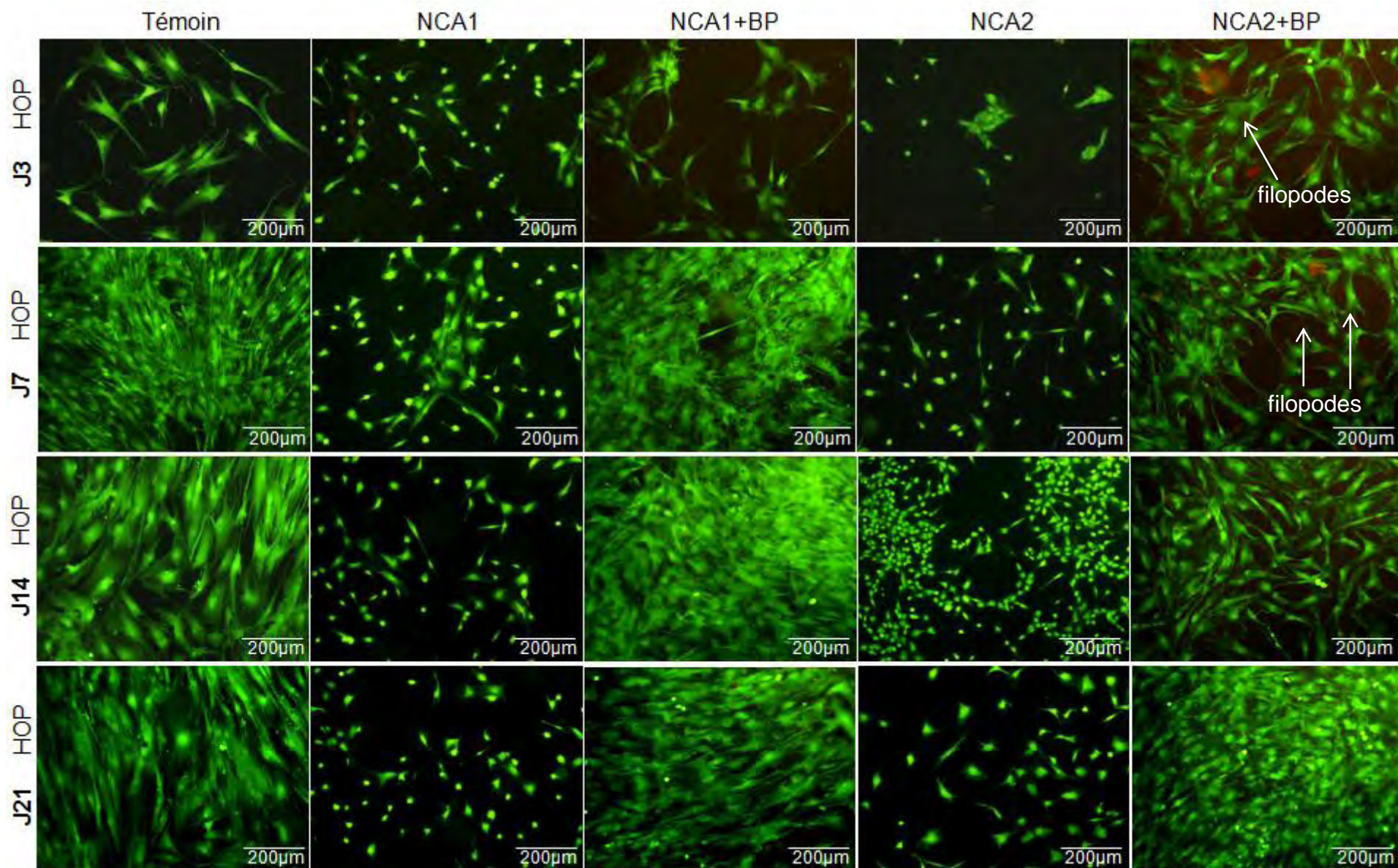


Figure 3-27: Analyses Live/Dead réalisées sur le témoin et les matériaux à analyser : NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP ensemencés par des cellules HOP à différents temps de culture : 3 jours (J3), 7 jours (J7), 14 jours (J14) et 21 jours (J21)

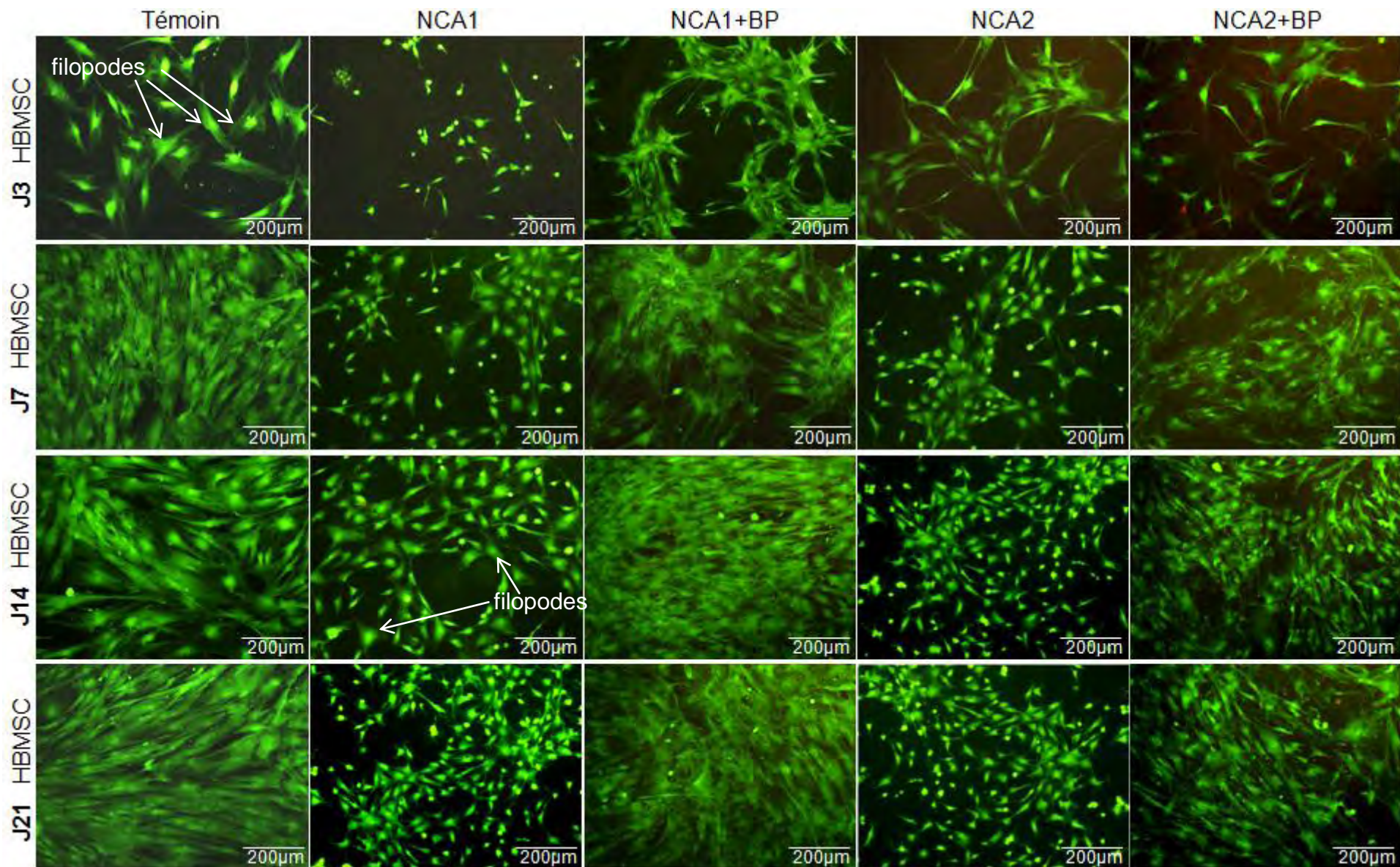


Figure 3-28: Analyses Live/Dead réalisées sur le témoin et les matériaux à analyser : NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP ensemencés par des cellules HBMSC à différents temps de culture : 3 jours (J3), 7 jours (J7), 14 jours (J14) et 21 jours (J21)

II. 2. 3. Différenciation cellulaire

L'évaluation de la minéralisation observée au microscope après coloration au rouge d'alizarine permettant d'étudier la différenciation des cellules HOP et HBMSC sur les témoins et les supports apatitiques NCA et NCA+BP est présentée en figure 3-30. Les dépôts de minéralisation sont observés par leur coloration plus ou moins intense. Les images obtenues par microscopie montrent que les supports ont bien été minéralisés contrairement au témoin signe d'une différenciation cellulaire à la surface des supports apatitiques quelle que soit la nature des cellules et plus particulièrement sur les supports avec tiludronate. La présence des molécules de tiludronate favorise donc la différenciation aussi bien des cellules HOP que des cellules HBMSC.

II. 2. 4. Morphologie cellulaire

La morphologie cellulaire a été observée en surface des composés NCA et NCA+BP après 21 jours de culture cellulaire à l'aide d'un microscope électronique à balayage dont les micrographies sont exposées, pour les deux types de cellules, en figure 3-31. Ces observations montrent la présence d'une monocouche cellulaire à la surface des supports. Ces données confirment les résultats qualitatifs obtenus par les analyses Live/Dead (figures 3-27 et 3-28) montrant un étalement cellulaire sur NCA+BP.

II. 2. 5. Expression des gènes

L'expression de quatre gènes, marqueurs ostéoblastiques: Oc, Cbfa1, Pal, MMP1 et MMP13 obtenue par PCR quantitative en temps réel est présentée sur la figure 3-32.

Les résultats obtenus par qRT-PCR exposés en figure 3-32 montrent une surexpression du gène Cbfa1 dans les HBMSC sur les supports NCA1+BP et NCA2, au bout de J3, ce qui indiquerait une différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules ostéoblastiques et une surexpression des gènes codant pour les MMP1 et MMP13 dans les HOP sur le support NCA2. De la même façon au J21 nous observons une surexpression du gène ostéocalcine (Oc) spécifique des ostéoblastes, exprimée lors d'une complète différenciation des OB, dans les cellules HOP et HBMSC sur les supports NCA1 et NCA1+BP ainsi qu'une surexpression des gènes de MMP1 et MMP13 dans les cellules HBMSC sur le support NCA2+BP.

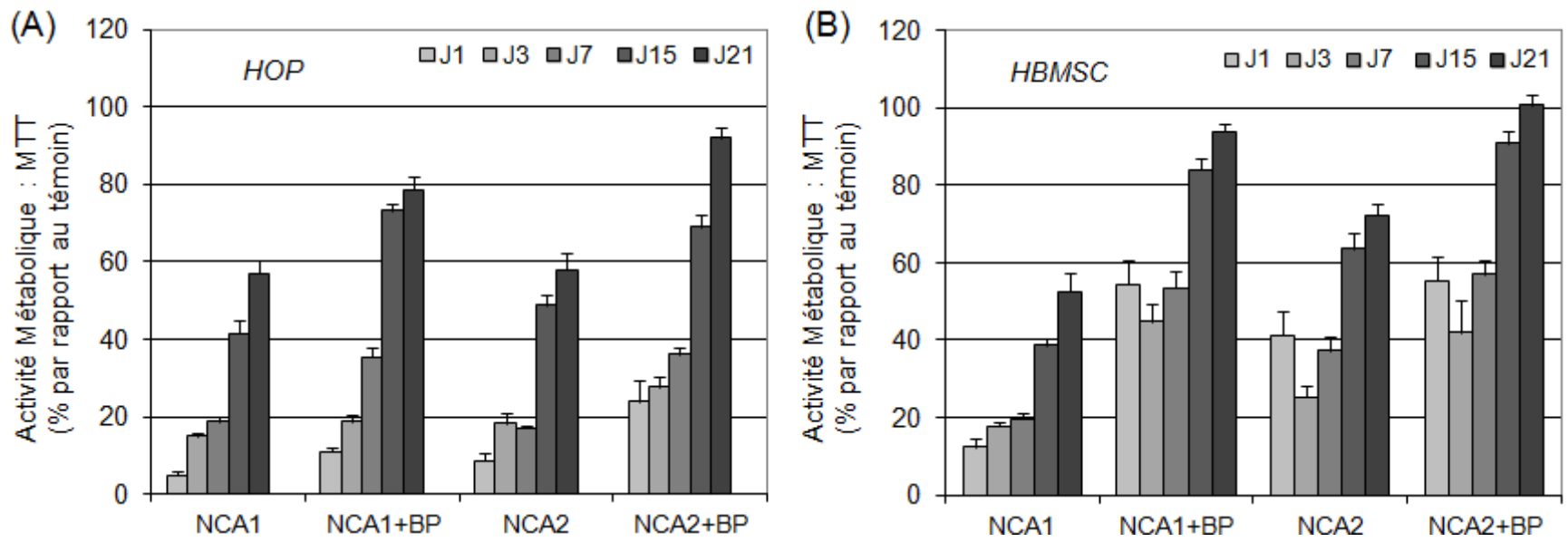


Figure 3-29:
Evolution de la prolifération cellulaire sur les apatites nanocristallines : NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP avec les cellules HOP (A) et HBMSC (B)

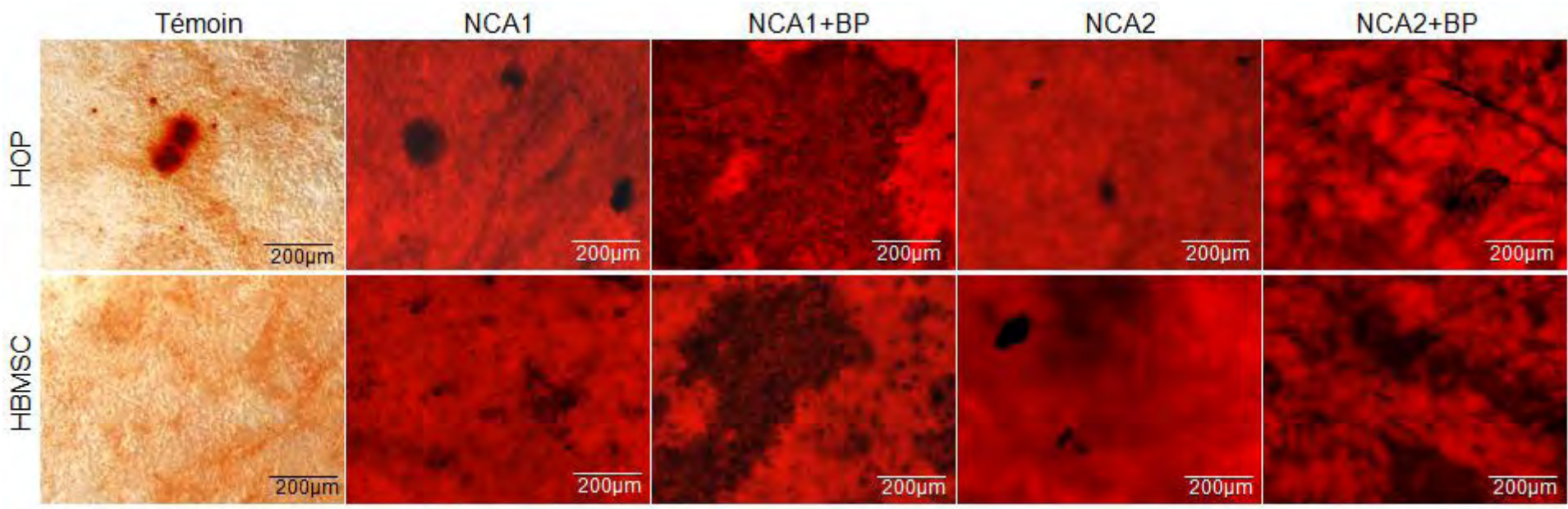


Figure 3-30: Evaluation de la différenciation des cellules HOP et HBMSC par coloration au rouge alizarine des témoins et des supports NCA1, NCA2, NCA1+BP et NCA2+BP après 21 jours de culture cellulaire

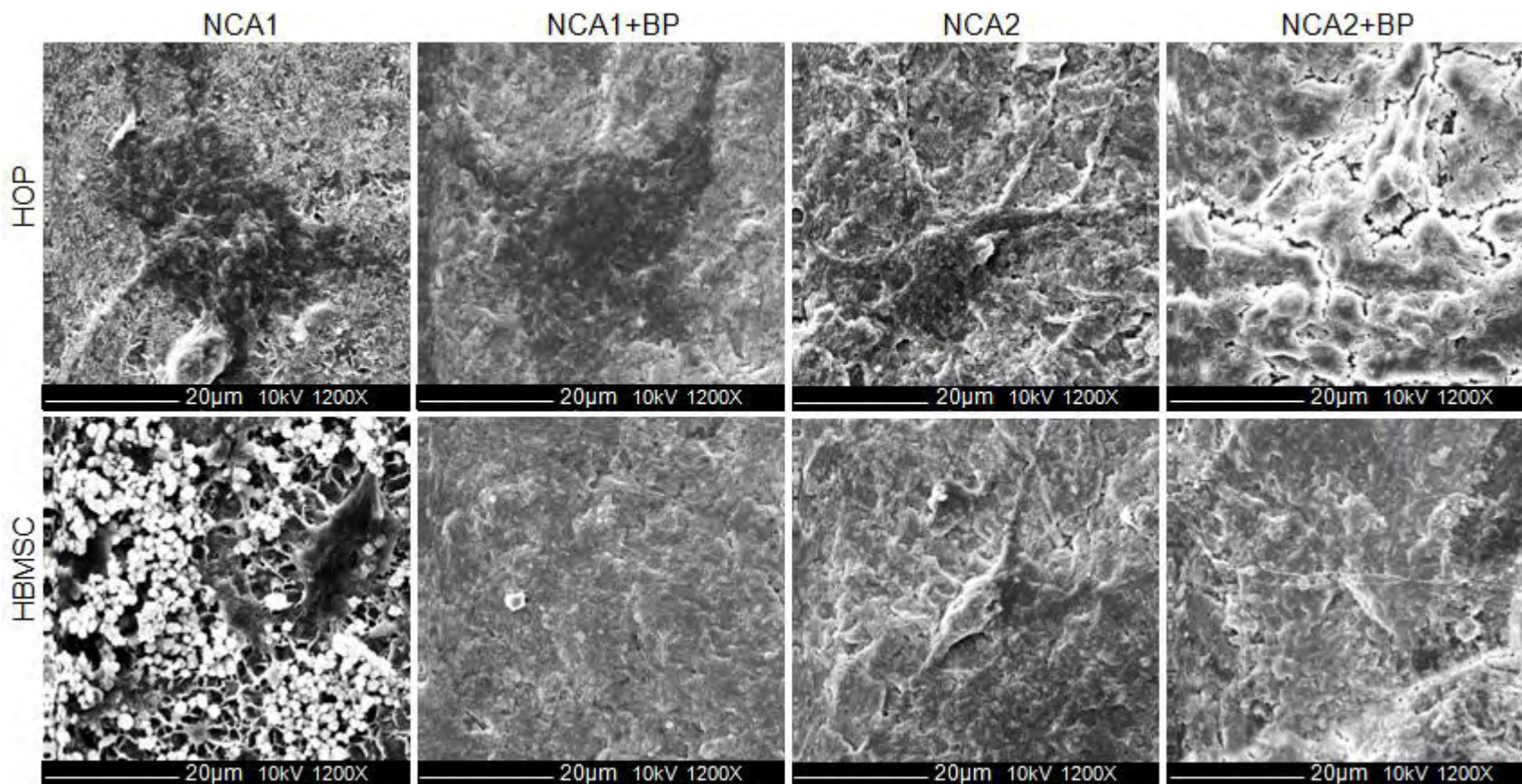


Figure 3-31: Observations par microscopie électronique à balayage des cellules HOP et HBMSC présentes à la surface des pastilles : NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP

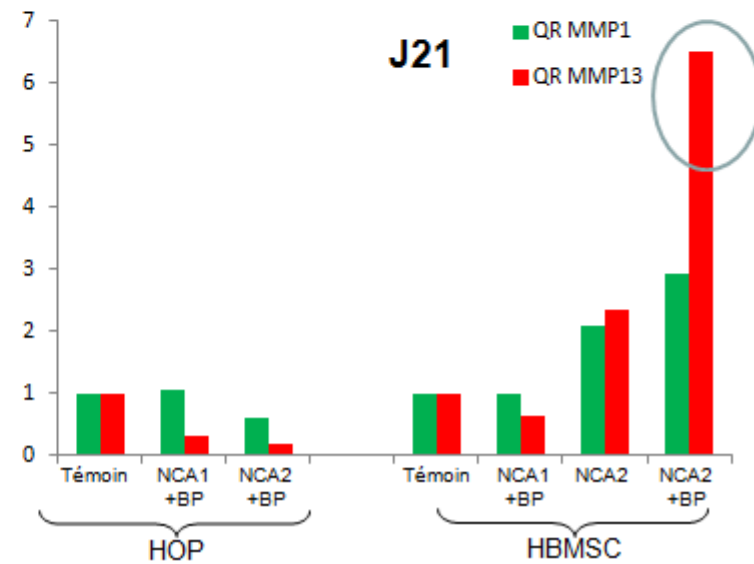
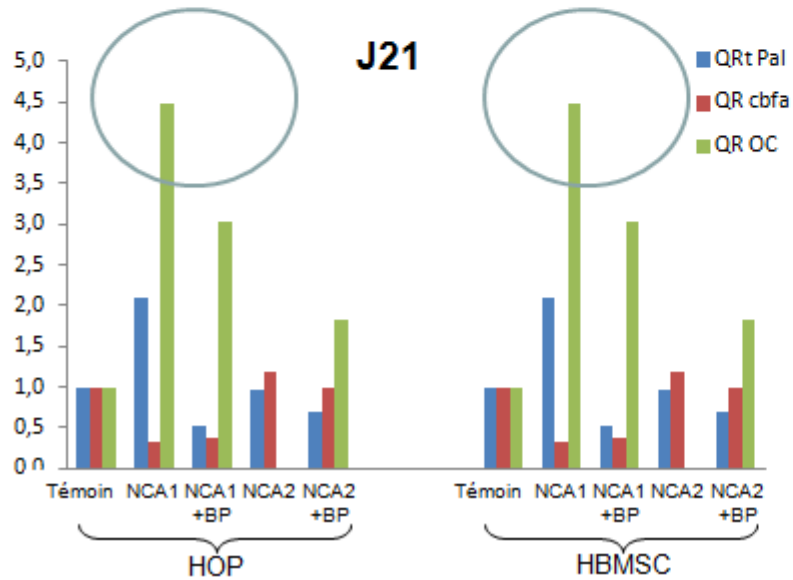
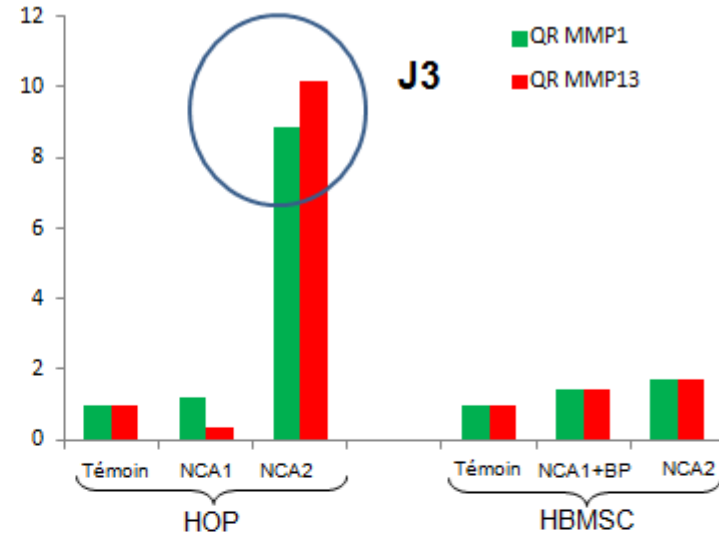
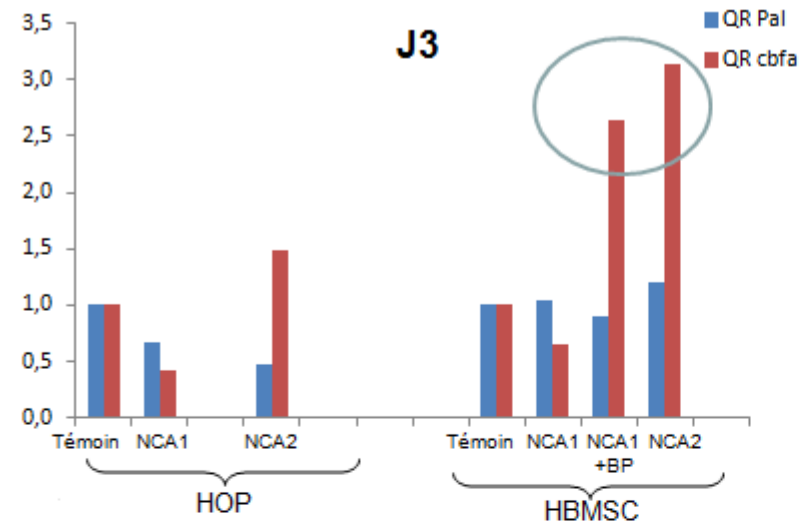


Figure 3-32: Expression des gènes : Oc, Cbfa, Pal, MMP1 et MMP13 à 3 jours (J3) et 21 jours (J21) pour les différents supports NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP avec les cellules HOP et HBMSC

II. 3. Etude physico-chimique de l'évolution du support et du milieu de culture cellulaire

Cette partie est focalisée sur le comportement des matériaux tout au long des tests cellulaires afin à la fois d'établir et d'identifier une possible évolution physico-chimique du support dans le milieu cellulaire. Aussi les supports apatitiques rincés, séchés et récupérés après les tests cellulaires ont été caractérisés.

II. 3. 1. Evolution des matériaux

II. 3. 1. a. FTIR

Les supports apatitiques sous forme de pastilles étant des apatites nanocristallines mal cristallisées biomimétiques, les nanocristaux vont subir une évolution physico-chimique au profit d'une structure cristalline plus stœchiométrique [Rey *et al.* 2007 b] lors de leur mise en solution aqueuse. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'évolution des ions (hydrogéo)phosphate présents dans la couche labile des supports apatitiques durant leur mise en culture cellulaire. Les spectres d'absorbance FTIR des pastilles de phosphate de calcium prélevées après différents temps de culture : 0 jour (J0), 3 jours (J3) et 21 jours (J21) ont été réalisés. Notons que le temps J0 correspond à la fin de l'étape de pré-incubation des supports dans le milieu de culture acellulaire (1 jour) juste avant l'ensemencement des supports. Les spectres, non présentés, possèdent des bandes d'adsorption identiques à celles observées précédemment (tableau 2-8 p. 49).

Afin de déterminer l'évolution de ces bandes, le traitement mathématique de décomposition a été appliqué à la région $740-425\text{ cm}^{-1}$ comportant les bandes d'absorption ν_4 et ν_2 des groupements phosphate, selon la méthode décrite par Rey *et al.* [Rey *et al.* 1990] comme précédemment. Ces décompositions des bandes IR, à l'aide du logiciel *Grams/386, Galactica*, permettent d'estimer quantitativement l'aire et l'intensité relative des différentes bandes attribuées aux divers groupements labiles. Les conditions de décompositions sont inchangées par rapport aux précédentes études. Rappelons que l'intensité relative des bandes est définie comme le rapport de l'aire de la bande considérée sur l'aire totale de toutes les bandes assignées aux groupements phosphate. Etant donnée l'existence, dans ce domaine de nombre d'onde, de bandes dues au tiludronate qui altèrent les résultats de la décomposition, nous nous sommes intéressés uniquement aux pastilles NCA1 et NCA2.

La figure 3-33 rend compte des intensités relatives de bandes correspondant aux ions labiles phosphate et hydrogénophosphate à différents temps de culture : J0, J3 et J21 pour les

supports apatitiques sans BP suite au traitement mathématique de décomposition appliqué aux bandes d'adsorption $\nu_4\text{PO}_4$ et $\nu_2\text{PO}_4$.

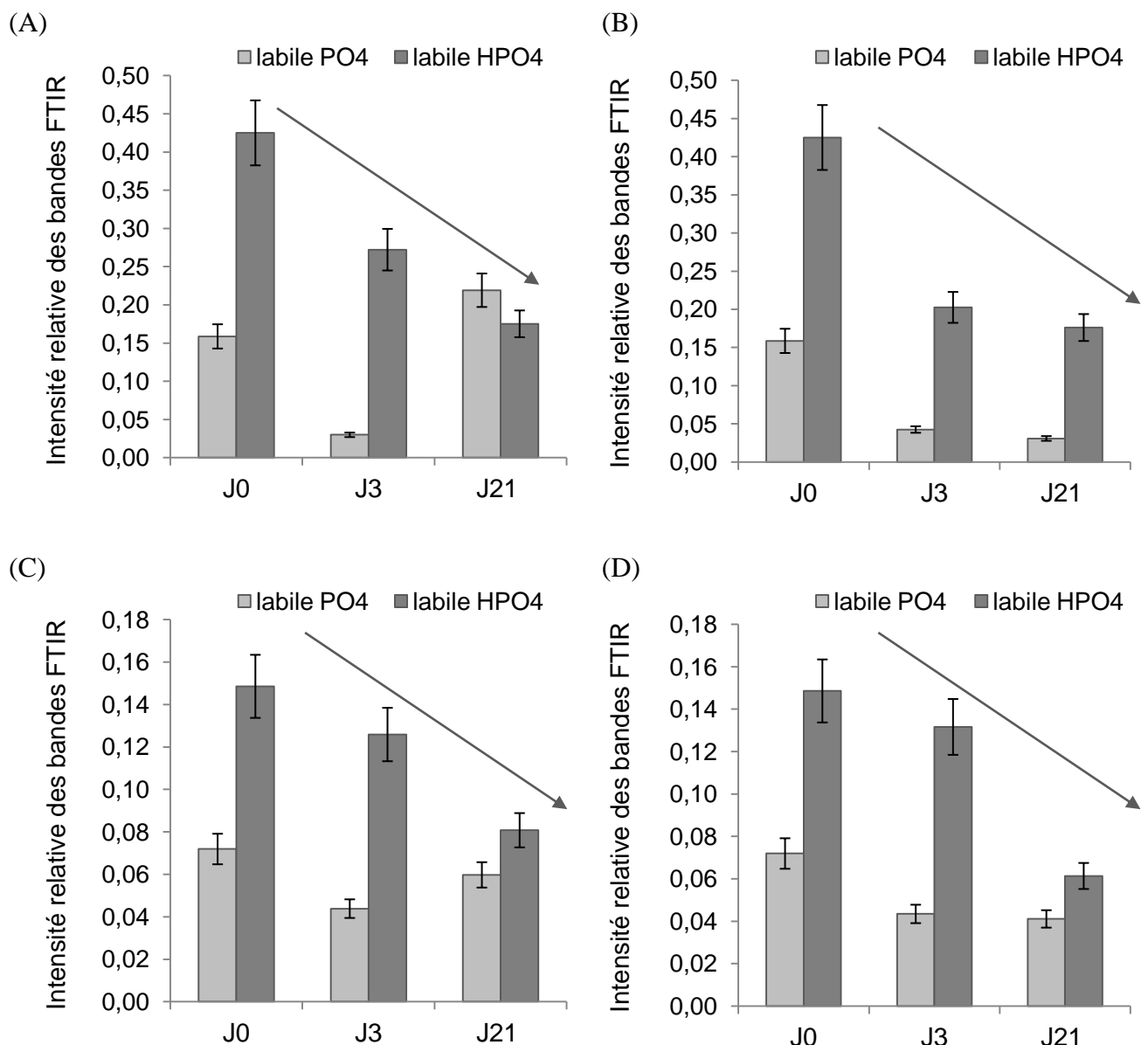


Figure 3-33: Evolution de la teneur en ions labiles phosphate et hydrogénophosphate à différents temps de culture : 0 jour (J0), 3 jours (J3) et 21 jours (J21) pour les composés NCA1 (A et B) et NCA2 (C et D) et pour les cellules HOP (A et C) et HBMSC (B et D), déterminée par spectroscopie FTIR sur la région spectrale : $740\text{-}425\text{ cm}^{-1}$ contenant les bandes d'adsorption $\nu_4\text{PO}_4$ et $\nu_2\text{PO}_4$

D'après la figure 3-33, une évolution de la teneur en ions labiles phosphate et hydrogénophosphate est constatée au cours de la culture cellulaire. En effet, la quantité en ions labiles à la fois hydrogénophosphate et phosphate diminue quelles que soient la nature du support apatitique et la nature des cellulesensemencées à leur surface. Néanmoins, une baisse bien plus nette est observée pour les ions labiles hydrogénophosphate tout au long des tests cellulaires soit pendant 21 jours.

Ces résultats sont différents de ceux présentés sur les pastilles exposées au milieu de culture acellulaire durant trois jours qui n'avaient pas révélé d'altération majeure, excepté une légère diminution des HPO_4^{2-} labiles à 3 jours pour NCA1. Pour des temps de contact beaucoup plus long avec un renouvellement du milieu, l'évolution des pastilles paraît beaucoup plus nette et paraît en accord avec l'évolution des poudres NCA liée à l'effet de la maturation obtenue dans le chapitre 2, mettant en évidence une forte perte de la teneur en ions labiles HPO_4^{2-} et une perte moindre des ions labiles PO_4^{3-} après une maturation en solution aqueuse de 31 jours. On peut remarquer que l'apatite NCA2 est également altérée malgré sa longue période de maturation préalable. Outre l'effet dû à la maturation la diminution des HPO_4^{2-} labiles pourrait également être en partie imputée, dans le cas des cultures cellulaires, à un échange avec les ions carbonate du milieu (les cellules sont cultivées sous une atmosphère à 5% de CO_2).

Notons la similitude de l'évolution de la teneur en ions labiles hydrogénophosphate pour chacun des supports quelle que soit la nature des cellules (figure 3-33, A-B et C-D). Malgré la formation de minéral, indiquée par le test à l'alizarine, en milieu de culture, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence d'apatite néoformée par les méthodes spectroscopiques (ces apatites seraient associées à du collagène). On peut penser que cette couche représente une faible proportion de la masse de la pastille et qu'il n'est pas possible de la détecter, et/ou qu'elle a été en partie éliminée dans le traitement préalable aux analyses physico-chimiques.

Remarquons que la carbonatation des supports NCA1 observée lors des tests *in vitro* quel que soit le type cellulaireensemencé (figure 3-34) confirme la maturation de cette apatite dans le milieu de culture.

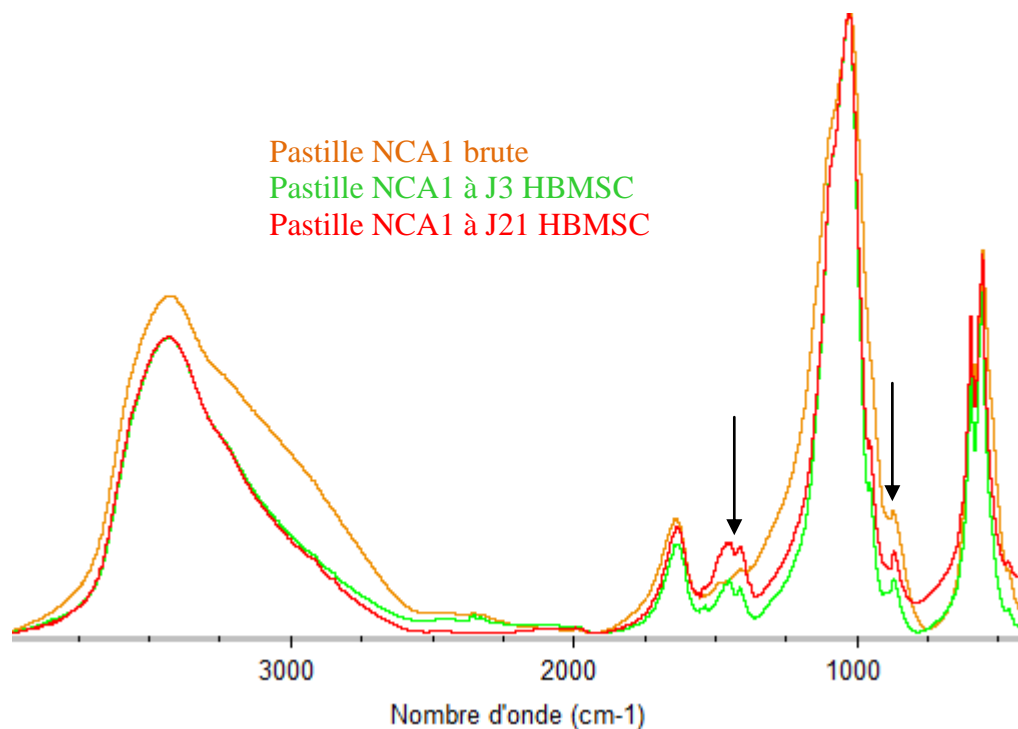


Figure 3-34: Spectres FTIR des pastilles NCA1 brute, à J3 et à J21ensemencées par des cellules HBMSC

II. 3. 1. b. Raman

L'évolution des supports apatitiques tout au long de la culture cellulaire a aussi été étudiée par spectroscopie Raman. La figure 3-35 rassemble les spectres Raman des pastilles NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP brutes et prélevées après deux temps de culture : 3 jours (J3) et 21 jours (J21) dans les deux types de culture cellulaire : HBMSC et HOP. Une normalisation de la bande vibrationnelle $\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1}) a été réalisée et les artefacts liés à l'appareillage ont été corrigés en vue de leur analyse comparative.

Les spectres Raman présentant l'évolution des pastilles NCA1 au cours de la culture cellulaire semblent montrer une disparition de la bande à 881 cm^{-1} attribuée dans le chapitre précédent aux HPO_4 tandis que les bandes des vibrations $\nu_3\text{PO}_4$ présentes à 1045 et 1071 cm^{-1} sont observées de façon plus distincte; ce phénomène est plus difficile à observer sur les spectres des supports NCA2 car la bande à 881 cm^{-1} est plus faible, et du fait de la contribution à 1071 cm^{-1} de la bande de vibration $\nu_1\text{CO}_3$ type B. Ces résultats sont en continuité avec ceux précédemment recueillis lors de l'étude préliminaire des supports en milieu acellulaire. Comme nous l'avons expliqué, ces résultats peuvent être attribués à plusieurs phénomènes dont l'origine dépend de la nature du support : pour le support non mûré NCA1 cette évolution est associée à une maturation vers une structure plus apatitique : la couche hydratée riche en ions HPO_4 diminue au profit des domaines apatitiques riches en PO_4 ; pour le support mûré NCA2, qui subissent ici une maturation

additionnelle de 21 jours, les phénomènes de surface ne semblent plus prédominer sur l'évolution des supports et l'altération du substrat est également apparente.

Les spectres Raman des composés NCA+BP montrent aussi une évolution des composés lors des tests cellulaires cependant plus difficile à analyser en Raman car les bandes de vibrations du tiludronate se superposent à celles des supports apatitiques. Toutefois, comme précédemment nous observons la disparition de la bande à 881cm^{-1} pour les mêmes raisons. De plus, la bande à 1098cm^{-1} attribuée à la présence de bisphosphonate sur le support est toujours observable, à tous les temps de culture, bien qu'elle paraisse moins bien résolue comme l'ensemble du spectre. Enfin, une bande supplémentaire est observée à 1596cm^{-1} par rapport aux spectres Raman des pastilles NCA+BP brutes (non immergées dans IMDM). Notons que cette bande n'est pas observée sur les spectres des supports NCA1 et NCA2 sans BP. Précédemment, nous avons mis en évidence une minéralisation plus importante sur les supports avec BP. La présence de cette couche néoformée pourrait modifier les propriétés de surface des supports. Des composés issus de l'IMDM (acides aminés par exemple) pourraient ainsi être « piégés » et/ou adsorbés en surface expliquant la présence de cette bande supplémentaire.

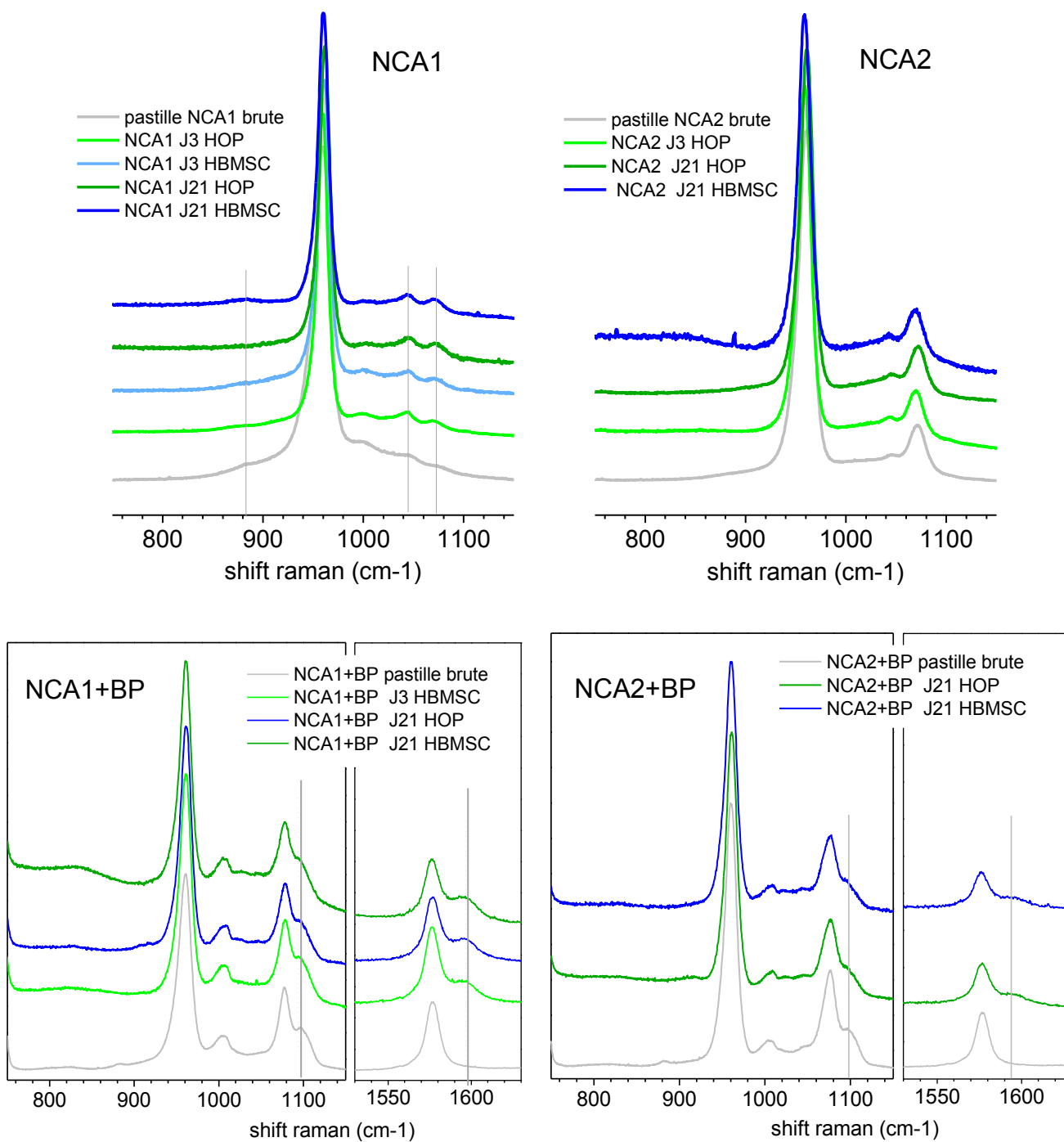


Figure 3-35: Spectres Raman des pastilles NCA1, NCA2, NCA1+BP et NCA2+BP brutes et après deux temps de culture (J3 et J21) pour les deux types de cellules (HOP et HBMSC)

II. 3. 2. Analyse du milieu : Dosage des ions calcium et phosphate

Le dosage des ions calcium et phosphore en solution par analyse ICP-AES a été réalisé à différents temps de culture (0 jour, 1 jour, 3 jours et 21 jours) et pour le témoin ainsi que pour chacun des composés mis en culture: NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP et ce pour les deux types de culture : HOP et HBMSC. Rappelons que le temps J0 correspond à la fin de

l'étape de pré-incubation des supports dans le milieu de culture acellulaire (1 jour) et que le témoin est le fond du puits de culture.

Cette étude permet de vérifier l'existence d'éventuelles réactions d'échanges ioniques entre les supports apatitiques et le milieu de culture cellulaire. L'évolution de la concentration en ions calcium et phosphore présents dans le milieu de culture tout au long de la culture cellulaire est exposée en figure 3-36.

A J0, pour le support NCA1, l'augmentation des ions calcium et phosphate en solution par rapport au témoin (puits sans support) témoigne d'une dissolution de l'apatite dès le premier jour de pré-incubation. Cette dissolution conduit à une acidification du milieu, comme nous l'avons déjà expliqué, et peut être exaltée par la présence de CO₂ dans l'étuve. La part de phosphate libéré étant bien plus importante que la part de calcium libéré (60 ppm de phosphate contre 20 ppm de calcium), la dissolution n'est pas le seul phénomène ; d'autres phénomènes sont aussi à l'origine de l'augmentation plus importante des ions phosphate en solution, tels que la carbonatation, par échange avec les ions phosphate de la surface, la maturation de l'apatite et l'adsorption de calcium en surface associée à la libération de protons, comme nous l'avons précédemment décrit, en accord avec Gustavsson *et al.* [Gustavsson *et al.* 2011]. Une fois le milieu renouvelé et les cellulesensemencées, à J1 et J3, l'augmentation des phosphates et la diminution du calcium par rapport au milieu témoin peuvent être attribuées à un phénomène associé à la libération de protons, comme nous l'avons précédemment décrit. A J21 on observe une diminution du calcium mais la concentration en phosphore, par rapport au témoin, reste relativement élevée. Si il y a neo-formation d'une apatite biologique, comme semble l'indiquer la coloration au rouge d'alizarine, elle se produit en partie aux dépens de l'apatite du substrat qui fournit les ions phosphates nécessaires.

A J0, pour le support NCA2, une diminution du calcium accompagnée d'une augmentation des phosphates par rapport au témoin est constatée. Dans ce cas, on ne peut pas affirmer que la dissolution est à l'origine de ces évolutions. Le phénomène semble être un phénomène de surface comme dans le cas de NCA1 lorsque le milieu a été renouvelé. Après le renouvellement du milieu, l'évolution du calcium et du phosphate reste quasiment constante. A J21, les concentrations en calcium et phosphate en solution ont diminué par rapport au témoin indiquant une néo-formation d'apatite, soit liée à l'activité cellulaire soit par nucléation et croissance sur la pastille.

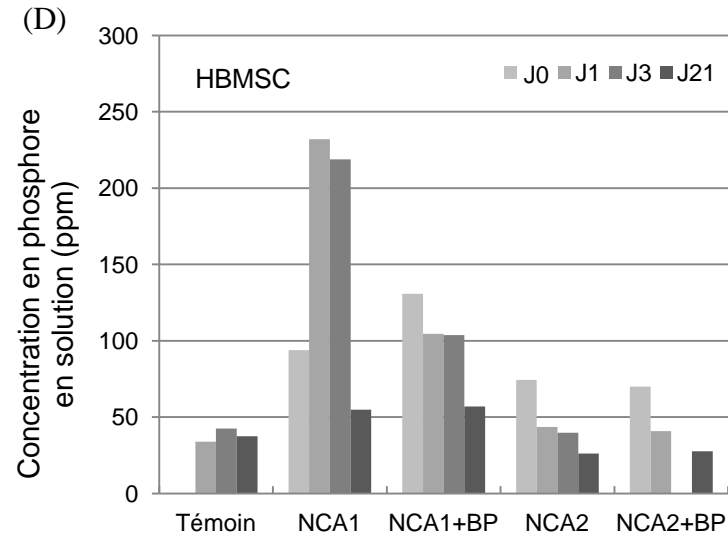
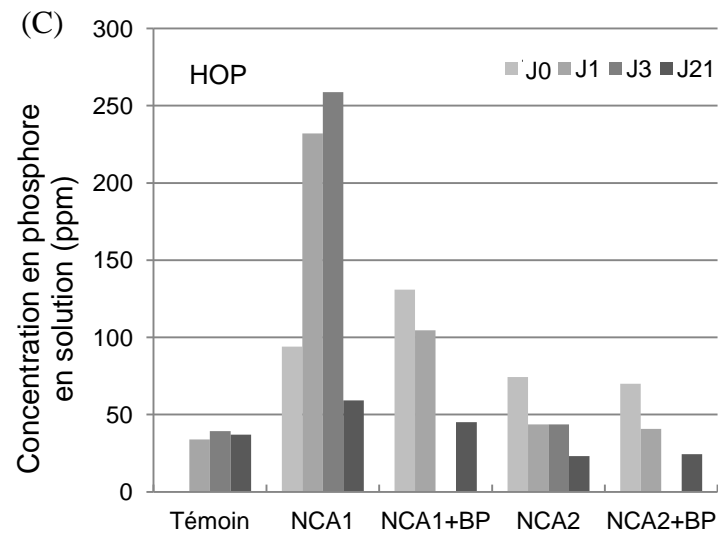
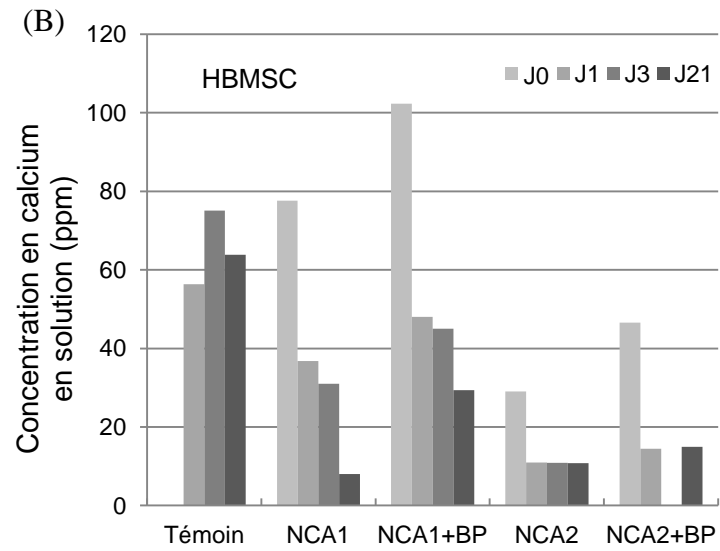
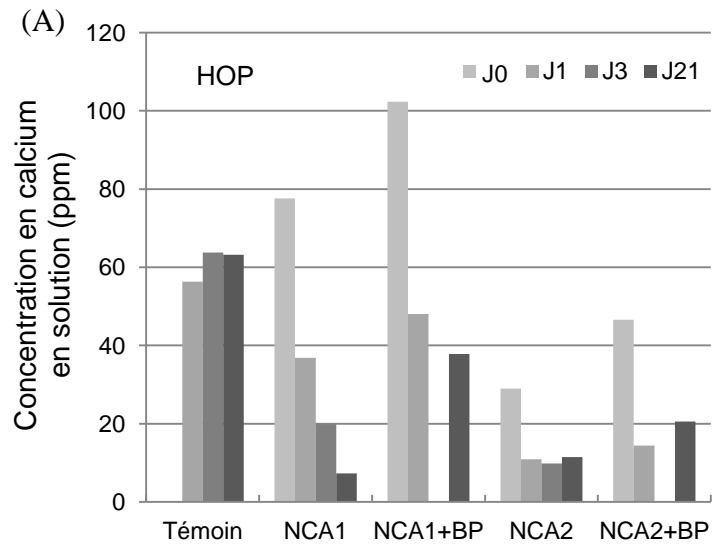


Figure 3-36:
Evolution de la teneur en ions calcium (A et B) et phosphore (C et D) dans le milieu de culture cellulaire à différents temps de culture : au temps initial (T0), après 1 jour (J1), 3 jours (J3) et 21 jours (J21) pour les cellules HOP (A et C) et HBMSC (B et D)

Le support contenant du tiludronate, NCA1+BP, libère plus de calcium et de phosphate en solution que son homologue sans BP. En analogie avec NCA1, l'augmentation du calcium en solution est moindre par rapport au phosphate libéré (95 ppm de phosphate contre 45 ppm de calcium) en comparaison au témoin. NCA1+BP présente donc les mêmes caractéristiques d'évolution que NCA1 bien que les phénomènes paraissent exaltés. L'évolution de NCA2+BP semble assez proche de celle de NCA2.

Notons que les deux supports contenant du tiludronate, aussi bien NCA1+BP que NCA2+BP, induisent une concentration en calcium en solution supérieure aux supports sans BP pourtant on aurait pu penser le contraire au vue des résultats de minéralisation biologique (rouge d'alizarine) de cinétiques de libération et de l'effet inhibiteur des BPs sur la dissolution mentionné par Fleisch *et al.* [Fleisch 2000].

D. Etudes du comportement des cellules pré-ostéoclastiques vis-à-vis d'apatites biomimétiques avec ou sans molécules de tiludronate

L'étude menée sur l'interface entre les biomatériaux à base d'apatites biomimétiques et les cellules ostéoclastiques est le fruit d'une collaboration avec l'équipe de recherche dirigée par Pierre Jurdic, *Institut de Génomique fonctionnelle de Lyon (IGFL), UMR 5242, Ecole Normale supérieure de Lyon, France*, dont les travaux portent notamment sur l'étude de la physiopathologie osseuse et plus particulièrement l'aptitude de la matrice extracellulaire d'os calcifié à se résorber. Cette étude a été financée par un appel à projet - Action interdisciplinaire CNRS 2011 « *Interface physique-chimie-biologie, soutien à la prise de risque* ». Dans le cadre de ce projet, un déplacement à Lyon a été effectué pour permettre l'observation, l'initiation à la biologie et à la manipulation en vue d'une meilleure compréhension et interprétation du comportement des cellules et des matériaux. Au jour d'aujourd'hui, une seule des campagnes prévues a été effectuée.

Cette collaboration vise à étudier de façon spécifique l'interaction entre des ostéoclastes, cellules résorbant l'os, et des apatites nanocristallines biomimétiques proches du minéral osseux avec un modèle d'« os jeune » et d'« os mature » possédant ou non une molécule active de type bisphosphonates. Les premiers résultats de cette étude préliminaire nous permettent dans un premier temps de vérifier la biocompatibilité et la non-cytotoxicité de nos matériaux vis à vis des ostéoclastes et dans un second temps de connaître l'influence de la nature de NCA et la faculté des molécules de BP adsorbée à induire ou affecter la résorption osseuse.

I. Matériaux et méthodes

I.1. Matériaux

Les supports apatitiques utilisés pour la culture cellulaire avec les cellules ostéoclastiques sont les même que ceux étudiés pour la culture cellulaire de HOP et HBMSC, soit les pastilles NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP élaborées selon le protocole précisé précédemment. Une dizaine de pastilles de chaque composition ont été nécessaires pour cette étude. Des pastilles supplémentaires d'HA et de β -TCP, de diamètre 13mm ont aussi été étudiées afin d'être comparées aux pastilles de NCA. Les pastilles de β -TCP sont obtenues

par compression de poudre commerciale puis calcinée à 900 °C pendant environ 40 heures. Les pastilles d'HA sont élaborées par pressage uniaxial à chaud d'une poudre synthétisée puis frittées à 1250°C. Les biocéramiques ainsi obtenues sont des pastilles denses avec une surface polie. Ces céramiques ont été choisies à titre de référence. En effet, le β TCP a à plusieurs reprises prouvé son aptitude à être résorbé par les ostéoclastes [Monchau *et al.* 2002].

Le contrôle positif de l'activité de résorption des ostéoclastes employé lors de ses tests cellulaires est une lame de verre recouverte d'une association d'apatite et de collagène notée ACC, préparée selon la méthode de Shibutani *et al.* [Shibutani *et al.* 2000].

1. 2. Culture cellulaire

1. 2. 1. Origine des cellules

Les prélèvements de la moelle osseuse murins sont réalisés à partir de tibia et de fémur de souris de 8 semaines après dissection

1. 2. 2. Conditions d'isolement et de culture des cellules

Les conditions d'isolement et de culture des cellules ainsi que le schéma descriptif de l'obtention de cellules est présent en annexe.

1. 2. 3. Conditions de culture

Dans un premier temps, les pastilles sont immergées dans 1mL de milieu de culture complet α MEM, contenant du sérum de veau fœtal, des antibiotiques et les cytokines (M-CSF et RANKL) pendant 24 heures, il s'agit de l'étape de pré-incubation. Ensuite, les pastilles ont été placées dans des puits puisensemencées à raison de 50000 cellules/cm². Les puits sont ensuite incubés à 37°C dans une atmosphère humide contrôlée pour la suite de l'expérience. Notons que des pastilles « témoin » immergées dans le milieu mais nonensemencées ont aussi été incubées selon le même protocole.

1. 2. 4. Techniques de caractérisation

1. 2. 4. a. Observation des cellules par coloration TRAP

La coloration des enzymes de la phosphatase acide tartrate résistante : TRAP permet de visualiser les cellules présentes sur les supports puis de les observer à l'aide d'un microscope optique classique. Les cytokines RANKL et M-CSF induisent la différenciation des

précurseurs en ostéoclastes. Une des manifestations de la différenciation des ostéoclastes est la synthèse d'une enzyme (l'enzyme Phosphatase acide résistante au tartrate) et c'est son activité que l'on détecte par le test TRAP. De nombreuses autres activités sont induites durant la différenciation des OC mais celle-ci est facile à mettre en évidence. La fixation TRAP est réalisée à l'aide d'un kit TRAP (Sigma-Aldrich). Le milieu de culture est ôté pour ne laisser que les cellules dans le fond du puits. Les cellules sont ensuite lavées, fixées à l'aide du réactif fixateur, rincées puis colorés suite à une mise à l'étuve à 37°C. Une fois la couleur optimale obtenue, les cellules sont lavées pour stopper la réaction et sont observées par microscope optique. Les cellules ainsi colorées en rose, à la fin des tests cellulaires, correspondent aux cellules multi nucléées TRAP positives c'est-à-dire aux ostéoclastes.

1. 2. 4. b. Observation des lacunes de résorption par microscopie

Les supports ont préalablement été colorés avec du bleu de toluidine pendant trois minutes afin d'optimiser l'observation des lacunes de résorption en microscopie. Les lacunes de résorption sont observées de façon individuelle ou en groupe à la surface des supports, dans un premier temps à l'aide d'un microscope optique durant la campagne de tests à Lyon à titre de « pré-observations » puis dans un second temps sur les mêmes supports rincés à l'aide d'un microscope électronique à balayage au laboratoire pour plus de résolution.

II. Résultats

II. 1. Essais préliminaires

En préambule de l'étape d'ensemencement des matériaux, l'étape de pré-incubation des matériaux dans le milieu acellulaire a permis de simuler les conditions générales de culture cellulaire et d'appréhender les éventuels problèmes liés à l'exposition des matériaux. Lors de cette étape de pré-incubation, une acidification du milieu a aussi été observée par un changement de couleur du milieu.

Des cinétiques de pH ont donc été réalisées selon le protocole décrit en chapitre 2 en immergeant les pastilles de NCA dans le milieu complet utilisé lors de la culture des cellules ostéoclastiques. Ces cinétiques présentent les mêmes allures que dans le milieu de culture ostéoblastique, aussi nous ne les montrerons pas.

La légère acidification a été relevée sur tous les puits contenant les matériaux aussi bien NCA que NCA+BP. Néanmoins, remarquons qu'après renouvellement du milieu de culture,

aucune autre acidification n'a été observée sur les milieux ultérieurs comme dans le cas des tests cellulaires ostéoblastiques.

II. 2. Etude du comportement cellulaire vis-à-vis des matériaux

L'étude du comportement des cellules ostéoclastiques au contact des apatites biomimétiques, grâce à l'observation de la morphologie des cellules et des lacunes de résorption par microscopie fait l'objet de cette partie. Ainsi, la cytotoxicité des matériaux vis-à-vis des ostéoclastes et l'influence de la nature de NCA et des molécules de bisphosphonates sur l'action résorptrice des cellules a été évaluée.

II. 2. 1. Observation des cellules par coloration TRAP

Les images des cellules obtenues par microscope optique après coloration TRAP en fin de tests sont exposées en figure 3-37. D'un point de vue global, les cellules présentes dans tous les puits de culture sont des cellules multinucléées qui n'affichent pas de signe de mortalité. Par conséquent, les matériaux sont non-cytotoxiques. Toutefois, la morphologie des cellules est très différente d'un support à l'autre.

En effet, dans un premier temps, au regard des cellules au contact des matériaux « références » : ACC, HA et β TCP, trois morphologies différentes sont observées. Pour l'ACC témoin, des cellules multinucléées de tailles diverses allant de petite (100 μ m) à grande (300 μ m) sont visualisées tandis que de grosses cellules de taille constante (150 μ m) sont observées pour HA et de petites cellules (50 μ m) possédant de longs filopodes pour le support β TCP.

Lors de l'observation des cellulesensemencées sur les supports apatitiques NCA et NCA+BP, la nature du modèle osseux ne semble pas induire de différence de comportement des cellules alors qu'une tendance se dégage mettant en avant l'effet de la présence des molécules de BP. En effet, les cellulesensemencées sur les matériaux composés de BP possèdent une taille plus importante (100 μ m) et de nombreux filopodes, signes d'un étalement cellulaire. La présence de ces filopodes dénote des remaniements importants dans les ostéoclastes puisque ceux-ci ont normalement l'actine organisée sous forme de podosomes et pas de filopodes. Ainsi, les molécules de tiludronate adsorbées sur les modèles osseux choisis ne semblent pas avoir d'effet inhibiteur sur le recrutement et la fixation des ostéoclastes, mais elles semblent altérer leur morphologie.

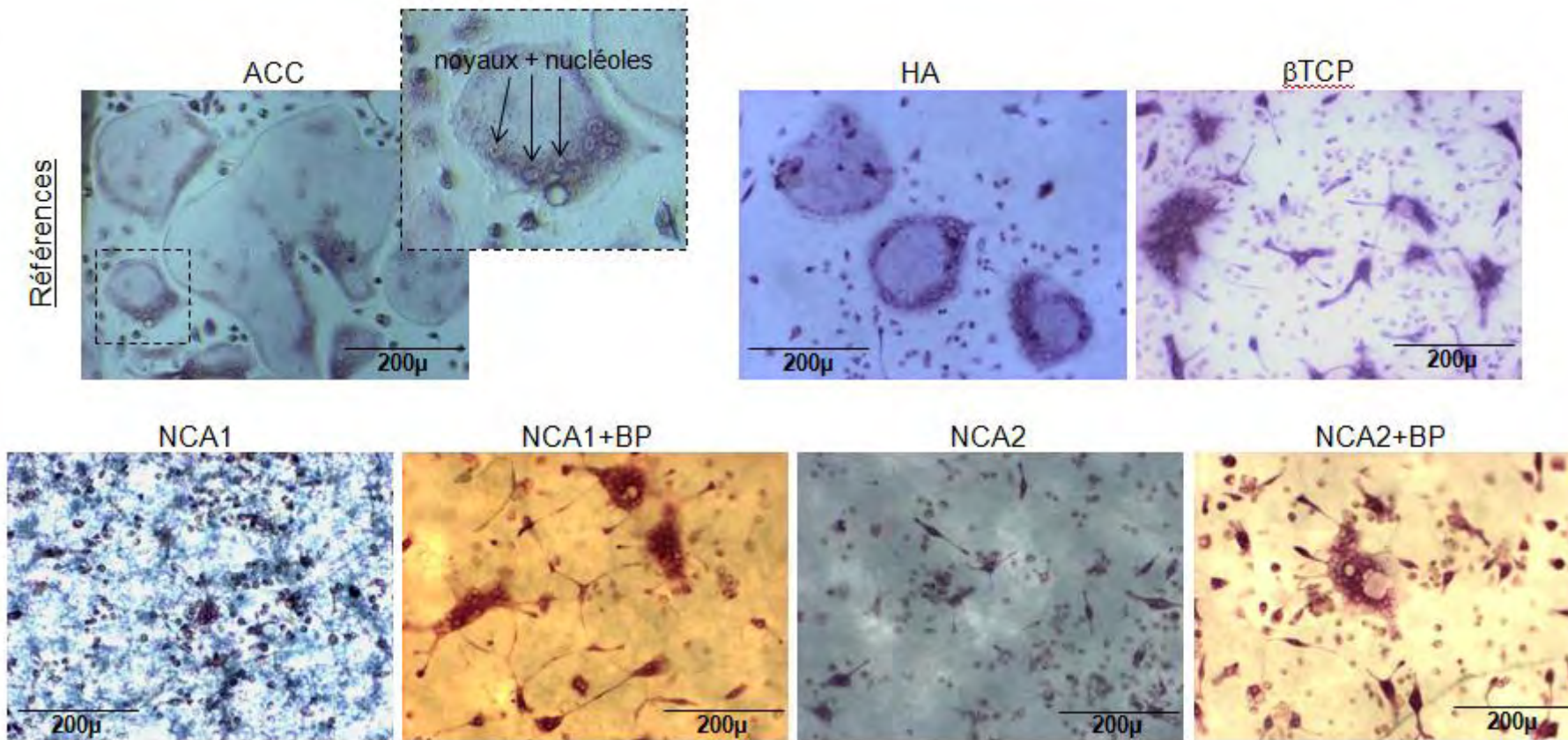


Figure 3-37: Images de microscope optique des cellules au contact des différentes références (ACC, HA et β TCP) et supports apatitiques (NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP) après coloration TRAP

II. 2. 2. Observation des lacunes de résorption par MEB

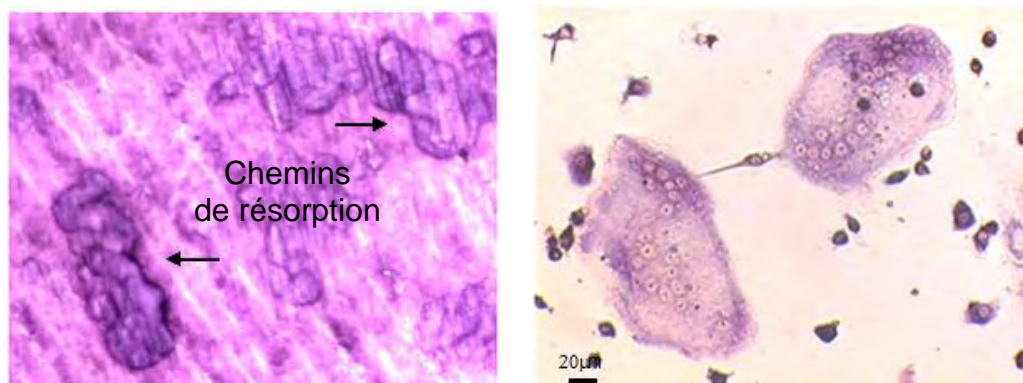
Une fois les cellules observées, les supports apatitiques ont été récupérés à la fin des tests cellulaires afin d'en caractériser la surface et de déterminer l'activité de résorption des ostéoclastes sur les différents supports.

II. 2. 2. a. HA et β TCP

Les surfaces des pastilles d'HA et de β TCP ont été observées par microscope électronique à balayage avant et après les tests de culture cellulaire afin de visualiser les lacunes de résorption créés sous l'action d'ostéoclastes. Les pastilles ont préalablement été métallisées à l'argent. Les images MEB sont présentes en figure 3-39. Les observations ont été réalisées sur les pastilles « témoin » présentes dans les puits contenant uniquement le milieu de culture et sur les pastillesensemencées.

Les images montrent des différences entre les supports HA et β TCP. En effet, aucun élément en surface des supports HA ne semble s'apparenter à une lacune de résorption tandis que des cavités sont distinguées en surface de β TCP. Ces cavités sont présentes sur toute la surface, de façon ponctuelle, de forme globalement circulaire et de taille homogène : diamètre constant proche de $10\mu\text{m}$. La taille des trous de résorption est faible. En effet, les lacunes de résorption généralement observées, sur la dentine par exemple, forment des chemins de résorption (figure 3-38) et non des lacunes de résorption dispersées ponctuellement en surface puisque la cellule migre sur le support successivement à son action de résorption.

Plusieurs hypothèses possibles peuvent être émises sur l'origine de la petite taille des trous de résorption observées sur HA et β TCP, soit ils sont faits par de petites ostéoclastes qui ont peu fusionné, soit par de gros ostéoclastes formant de petites zones de scellement (environnement peu satisfaisant par exemple).



**Figure 3-38: Images de chemins de résorption observées sur de la dentine (A) ainsi que les ostéoclastes responsables de cette résorption (B) (Photo de P. Jurdic)
Echelle : 1cm= 20 μm . (La coloration violette est due à une coloration TRAP).**

Toutefois, le flou de l'image de la tâche circulaire présente sur le support β TCP (figure 3-39) est probablement dû à une différence de profondeur entre les contours de la tâche et le cœur de la tâche laissant supposer la présence d'une lacune de résorption plutôt qu'un résidu de cellule. Aussi, les tâches repérées sont assimilées à des lacunes de résorption.

Notons sur la figure 3-39 que certaines lacunes de résorption en surface de β TCP semblent toutefois former un agglomérat de lacunes correspondant vraisemblablement au chemin de résorption emprunté par le ou les ostéoclastes. Un dénombrement de lacunes de résorption en surface des pastilles de β TCP a été réalisé de façon semi-quantitative sur quelques clichés (figure 3-39) à l'aide d'un maillage de la surface et semble présenter une densité de l'ordre de 5 lacunes pour $10000\mu\text{m}^2$.

Les mêmes différences de comportement vis-à-vis des ostéoclastes entre ces deux supports HA et β TCP ont déjà été notées dans la littérature par Yamada et al. [Yamada *et al.* 1997]. Leur étude porte sur l'activité de résorption d'ostéoclastes issus de cellules osseuses de lapins néonataux sur des céramiques d'HA et de β TCP obtenues à base de poudres d'apatite déficiente en calcium pressées puis frittées. Les auteurs [Yamada *et al.* 1997] n'ont observé aucune lacune de résorption en surface de HA tandis que des lacunes ponctuelles discontinues au nombre de 40 à 60 par pastille, soit 5 à 8 lacunes pour $10000\mu\text{m}^2$, sont constatées pour β TCP. Une des raisons évoquées par les auteurs est la solubilité plus importante de β TCP qui favorise la libération d'ions calcium dans l'environnement acide présent à l'interface ostéoclastes-céramiques modifiant ainsi l'action de résorption des cellules vis-à-vis des biomatériaux. Cette modification conduit alors à l'observation de petites lacunes discontinues. Notons que l'absence de lacunes de résorption apparentes en surface de l'HA a aussi été remarquée par Redey et al. [Redey *et al.* 1999]. Lors de leur étude, des pastilles d'HA synthétisée par double décomposition et frittée ont été mis au contact de cellules issues de pulpe de tibia murin. Les auteurs ont considéré eux aussi que l'aptitude du support à être dissout est un facteur clé de la formation des lacunes de résorption [Redey *et al.* 1999].

Dans notre cas, compte tenu de l'absence de lacunes de résorption sur les supports d'HA, seul le β TCP servira de référence lors de l'étude du comportement cellulaire vis-à-vis des apatites nanocristallines biomimétiques.

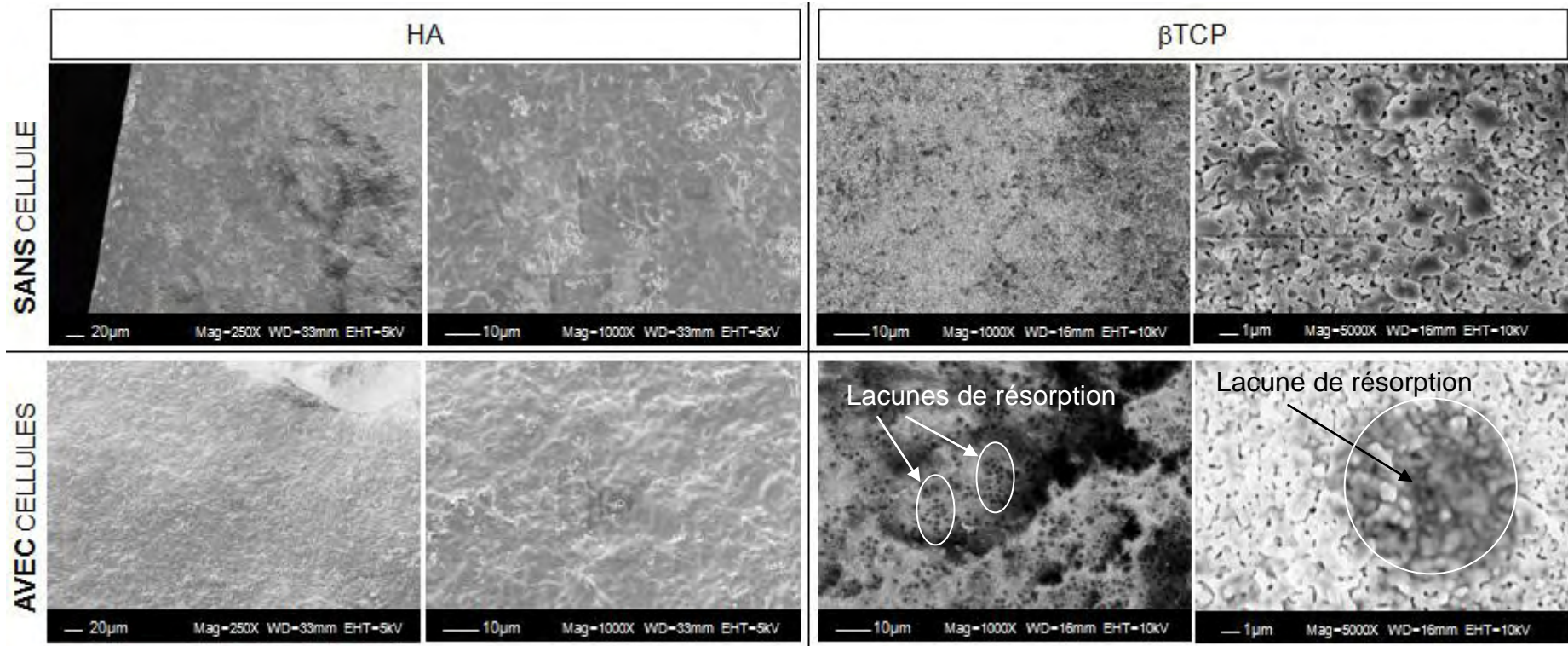


Figure 3-39: Observations au microscope électronique à balayage de la surface des pastilles HA et β TCP sans et avec les cellules ostéoclastiques soit avant et après les tests cellulaires

II. 2. 2. b. NCA1, NCA2, NCA1+BP, NCA2+BP

Les surfaces des pastilles élaborées à base des composés NCA synthétisées : NCA1 et NCA2 et ayant adsorbé du tiludronate : NCA1+BP et NCA2+BP ont aussi été observées par MEB à la fin des tests de culture cellulaire comme les pastilles HA et β TCP afin de visualiser les lacunes de résorption des ostéoclastes. Les pastilles ont préalablement été métallisées à l'argent. La figure 3-40 rassemble les images MEB de ces composés ainsi que celles de la référence β TCP en vue de leur comparaison. De plus, à titre comparatif, une image MEB de la surface de la pastille NCA2 avant les tests cellulaires soit « sans cellule » est présentée sur la figure 3-40. Notons que les surfaces des pastilles NCA et NCA+BP « sans cellule » sont semblables, aussi une seule image MEB de NCA2 a été exposée sur la figure 3-40 à titre d'exemple.

Les images MEB de la surface des pastilles NCA et NCA+BP après contact avec les ostéoclastes montrent des lacunes de résorption identiques à celles principalement observées en surface de la pastille de β TCP à savoir des lacunes ponctuelles de forme globalement circulaire et de diamètre homogène d'environ $10\mu\text{m}$. Toutefois, la répartition de ces lacunes de résorption est très différente entre les composés NCA et NCA+BP. En effet, la surface des pastilles de NCA1 et NCA2 présente beaucoup de lacunes de résorption tandis que la surface des pastilles NCA+BP ne comporte que quelques lacunes de résorption éparpillées çà et là en surface. La densité de lacunes de résorption en surface des pastilles de NCA+BP et NCA a été dénombrée de façon semi-quantitative sur 5 à 10 clichés à l'aide d'un maillage de la surface et semble être inférieur à $0,05$ lacunes/ $10000\mu\text{m}^2$ pour NCA+BP et de l'ordre de 2 à $2,5$ lacunes/ $10000\mu\text{m}^2$ pour NCA soit respectivement cent fois et deux fois moins que pour la surface de β TCP.

Ces observations ne mettent pas en évidence de façon significative des différences entre les supports NCA1 et NCA2 et la référence β TCP. Toutefois, l'influence de la présence de BP a pu être montrée lors ces tests. En effet, la présence de molécules de bisphosphonates engendre la diminution des lacunes de résorption en surface des modèles osseux synthétisés.

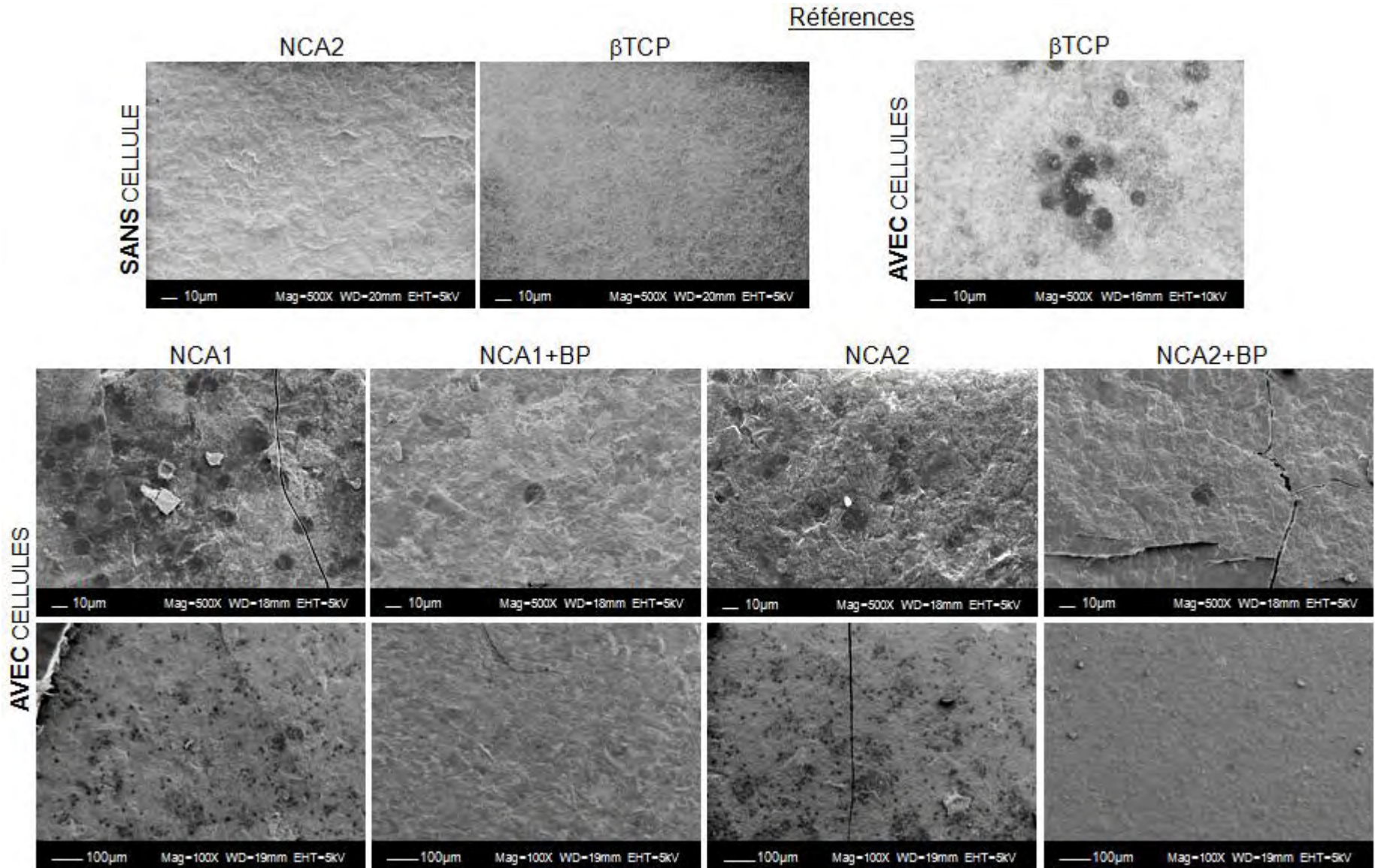


Figure 3-40: Observations par MEB de la surface des pastilles NCA1, NCA1+BP, NCA2 et NCA2+BP après les tests cellulaires à titre d'exemple la surface de la pastille NCA2 avant les tests cellulaires et à titre de références la surface de la pastille β TCP avant et après tests cellulaires

E. Discussion

Les modèles analogues au minéral osseux jeune et mature synthétisés et caractérisés dans le chapitre précédent avec et sans tiludronate ont fait l'objet d'études *in vitro* sous forme de pastilles afin d'une part d'appréhender l'effet du modèle osseux sur le comportement des cellules osseuses et d'autre part de comprendre l'influence de la présence du tiludronate sur la réponse cellulaire.

La caractérisation, par différentes techniques, de ces pastilles de NCA a permis de déterminer les propriétés physico-chimiques des supports utilisés pour les tests *in vitro*. Les pastilles obtenues à partir des poudres NCA1 et NCA2 présentent une nanoporosité proche. Les analyses spectroscopiques FTIR et Raman ainsi que la diffraction des RX ont montré que la mise en forme ne modifiait pas les propriétés physico-chimiques des poudres nanocristallines apatitiques étudiées. Cependant la compression des poudres selon la normale à la surface favorise une orientation préférentielle des nanoparticules et semble aligner les plaquettes de NCA parallèlement à la surface. Nous avons également mis en évidence par XPS/ESCA que l'usage de joints en téflon lors de la mise en forme contribue à une contamination de la surface des pastilles par le fluor. Cette contamination inévitable a donc ainsi pu être minimisée en optimisant les conditions de mise en forme, et également grâce à la stérilisation des pastilles et à leur pré-incubation dans le milieu de culture avant leur ensemencement par les cellules dans un nouveau milieu.

L'étude de cette pré-incubation des pastilles dans le milieu de culture exempt de cellule a permis de mettre en évidence l'existence d'une acidification du milieu associée à une variation de la composition des ions en solution et à une évolution des supports apatitiques. Ces évolutions diffèrent selon la nature du support. Dans le cas des apatites maturées NCA2, ce sont les phénomènes de surface qui prédominent tandis que pour l'apatite NCA1, le développement des domaines apatitiques associé à la libération de phosphore en solution montre que la maturation des nanocristaux est le phénomène prépondérant.

La caractérisation complète des supports et la réalisation de ces tests d'incubation préliminaires aux tests *in vitro* permettent donc de mettre en évidence le caractère évolutif des apatites nanocristallines biomimétiques, déjà montré par Rey *et al.* en milieu aqueux, au contact d'un milieu biologique exempt de cellule et les disparités existantes entre les supports afin d'appréhender leurs comportements en présence des cellules.

L'étude de l'interaction entre une apatite nanocristalline ayant adsorbée ou non du tiludronate et des cellules HOP et HBMSC révèle la non cytotoxicité des supports apatitiques étudiés.

La nature du support semble avoir une influence uniquement sur l'étalement des cellules, un modèle d'os « jeune » NCA1 non maturé et non carbonaté favorisant cet étalement par rapport au modèle d'os « mature » NCA2, tandis que la cinétique de prolifération est similaire quelles que soient les cellulesensemencées et la nature des supports. Cette différence peut être attribuée à une différence de solubilité des deux supports et/ou d'énergie interfaciale. Une minéralisation des supports, signe de la différenciation cellulaire, ainsi que la présence d'une monocouche cellulaire en surface des supports est observée. De plus, la surexpression des gènes : Cbfa1, facteur de transcription induisant la différenciation cellules mésenchymateuses et Oc, exprimée lors d'une complète différenciation des cellules, confirme la différenciation cellulaire.

La présence de BP en surface des supports montre des effets plus significatifs, l'étalement est favorisé et la prolifération est stimulée quelles que soient les cellulesensemencées. Toutefois des différences entre les supports existent pouvant être attribuées à la quantité de BP adsorbée: le support NCA1 plus soluble et contenant plus de tiludronate que NCA2 est susceptible pour un temps donné de libérer plus BP que NCA2. La minéralisation semble quant à elle un peu plus importante en présence de BP attestant d'une différenciation cellulaire favorisée en accord avec l'expression des gènes. Ces résultats mettent donc en évidence l'action directe du tiludronate sur les ostéoblastes.

Ces conclusions sont en accord avec les quelques études menées à l'interface entre biomatériaux apatitiques, molécules de bisphosphonate et cellules osseuses. En effet, les études menées, notamment par Bigi *et al.*, démontrent l'action de diverses molécules de BP associées à un composé phosphocalcique sur la prolifération de cellules telles que celles de la lignée de cellules ostéoblastiques : MG63. Ainsi, les auteurs ont mis en évidence la faculté des molécules d'alendronate et de pamidronate à promouvoir la prolifération et l'expression des gènes de MG63, lors de leur interaction avec un ciment à base de phosphate de calcium pour la phase solide et d'une solution aqueuse d'alendronate pour la phase liquide [Panzavolta *et al.* 2009]. Puis, les auteurs ont démontré la capacité des molécules d'alendronate à promouvoir l'activation des ostéoblastes et du processus de minéralisation de la matrice extracellulaire lors de l'interaction entre un composite hydroxyapatite-alendronate

nanocristallin élaboré par précipitation du BP lors de la synthèse de l'hydroxyapatite déposée ou non sur un substrat en titane [Boanini *et al.* 2008; Bigi *et al.* 2009].

L'étude de l'interaction entre des ostéoclastes murins et les supports apatitiques c.à.d. les deux modèles osseux assimilés à un os « jeune » (NCA1) et un os « mature » (NCA2) ayant adsorbé ou non le tiludronate, a permis d'évaluer l'impact de la nature du modèle osseux mais aussi et surtout l'influence de la présence du BP sur le recrutement et l'activité de résorption des ostéoclastes.

Contrairement à nos attentes nous n'avons pas observé de différence sur la différenciation et l'activité des ostéoclastes entre les deux supports représentant respectivement un os jeune et un os vieux. Le caractère nanocristallin des apatites testées, ou encore la présence de carbonate, le temps de maturation ou la topographie de surface n'ont pas eu d'influence sur les résultats des tests ostéoclastiques obtenus dans cette étude. Il existe pourtant de grandes différences de solubilité entre ces deux apatites, comme le montrent les études en milieu de culture acellulaire. Il semble donc que ce paramètre ne soit pas le seul à prendre en compte. Un autre paramètre important régulant l'activité ostéoclastique est l'acidité de la solution. Si on considère ce paramètre, NCA1 produit beaucoup plus d'acide que NCA2 en milieu de culture mais elle n'est pas résorbée plus activement. Notons également que nos nanocristaux sont orientés à la surface des pastilles et présentent leur face la plus stable (la plus développée). Ce n'est pas le cas dans les tissus osseux où le remodelage se réalise avec une orientation plus désordonnée des cristaux. Il serait donc intéressant d'étudier la résorption ostéoclastique avec une orientation différente des cristaux.

En ce qui concerne les surfaces ayant adsorbé le tiludronate l'effet sur la résorption ostéoclastique est notable quel que soit le support, mais ici également le temps nous a manqué pour analyser ce phénomène et l'expliquer.

Toutefois, une influence de la présence du tiludronate sur le comportement des ostéoclastes a pu être montrée lors de ces tests. En effet, la présence de molécules de bisphosphonates engendre la diminution des lacunes de résorption en surface des modèles osseux synthétisés. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par d'autres auteurs. L'étude menée par Murakami *et al.* [Murakami *et al.* 1995] sur l'effet du tiludronate dissout dans le milieu de culture sur le recrutement et les fonctions des ostéoclastes montre que le tiludronate en solution n'a pas un effet inhibiteur sur le recrutement des ostéoclastes et sur la formation d'anneau d'actine mais un effet inhibiteur spécifique sur la formation des lacunes de

résorption par des ostéoclastes polarisés possédant une bordure en brosse après incorporation de BP dans la cytoplasme via les bordures en brosse. Ainsi, les molécules de BP s'incorporent dans l'ostéoclaste et agissent directement sur l'organisation du cytosquelette [Murakami *et al.* 1995]. Ces observations sont en accord avec nos résultats bien que les molécules de BP soient adsorbées sur un support biomimétique dans notre cas et non mis en solution dans le milieu de culture. Compte tenu de la très faible libération de tiludronate adsorbé, il serait intéressant de déterminer si les mêmes effets cellulaires sont en cause dans notre cas.

Flanagan *et al.* [Flanagan *et al.* 1991] ont aussi observé la présence de lacunes atypiques et faiblement formées à la surface d'un os contenant une autre molécule de BPs, l'alendronate, mettant en évidence l'inhibition de la fonction des ostéoclastes par l'alendronate présent en surface de l'os. Les mêmes auteurs ont montré que le potentiel inhibiteur des lacunes de résorption est favorisé lorsque le bisphosphonate est adsorbé en surface de l'os et non simplement présent dans le milieu de culture. Les auteurs précisent donc que l'effet biologique des BPs est déterminé par la densité de BPs présent sur l'os. Josse *et al.* n'ont, quant à eux, pas observé de différence significative de l'effet inhibiteur de résorption osseuse du zolédronate lorsqu'il est en solution et lorsqu'il est adsorbé sur une apatite déficiente en calcium [Josse *et al.* 2005].

Cette étude préliminaire avec les cellules ostéoclastiques murines donne des résultats intéressants, toutefois une caractérisation approfondie de la morphologie des ostéoclastes et de la surface des supports après les tests cellulaires reste à faire. Une étude par microscope à force atomique (AFM) des supports en fin de culture, par exemple, permettrait de définir la topographie des pastilles et de visualiser les lacunes de résorption de façon plus précise et d'en déterminer les profondeurs et les superficies. Une analyse de surface par spectroscopie Raman, quant à elle, informerait sur la présence de protéines résiduelles ou des modifications chimiques de surface. L'observation par MEB et/ou AFM des supports avec les cellules préalablement fixées en surface fournirait des données sur la morphologie des cellules. Enfin, une étude biologique de l'organisation du squelette d'actine des ostéoclastes mis en contact sur nos supports préciserait le comportement biologique des cellules sur les différentes natures de substrats apatitiques.

Conclusion générale

Dans notre étude, trois apatites nanocristallines de synthèse: NCA1, NCA2 et NCA3 ont été élaborées comme modèles d'apatites biologiques en modulant la maturation et la présence des ions carbonates. Ces apatites phosphocalciques nanocristallines biomimétiques synthétisées possèdent, comme le minéral osseux, une couche de surface hydratée caractéristique, constituée d'ions faiblement liés ce qui leur confère une certaine mobilité ionique et favorise des réactions d'échange ionique avec la solution environnante. NCA1, pauvre en carbonate et riche en ions HPO_4^{2-} avec une couche hydratée très développée se rapproche du minéral osseux jeune ; NCA2, plus riche en carbonate et plus pauvre en ions HPO_4^{2-} avec une couche hydratée moins développée que NCA1, est proche d'un minéral osseux mature et NCA3, riche en ions OH^- et plus proche de l'hydroxyapatite stœchiométrique, est comparable aux cristaux matures d'email.

L'étude de l'adsorption et de la libération d'un bisphosphonate, le tiludronate, à partir d'apatites nanocristallines biomimétiques illustre des différences de comportement de ces composés minéraux. Cette adsorption suit un isotherme de type Langmuir et le mécanisme mis en jeu est un échange ionique entre les phosphates issus du minéral osseux et les phosphonates du principe actif. Pour chaque molécule de tiludronate fixée sur NCA1, NCA2 et NCA3 respectivement 1,23 ; 1,26 et 2,20 groupements phosphate sont libérés. La quantité adsorbée à saturation, N, ainsi que la constante d'équilibre ionique K_e ont ainsi été déterminées en prenant en compte le rôle des phosphates dans l'échange. Une modélisation de l'interaction entre les molécules de tiludronate et les différents NCA a été établie en nous basant sur de précédentes études menées par Mukherjee *et al.* [Mukherjee *et al.* 2008; Mukherjee *et al.* 2009] et en prenant le phosphate octocalcique (OCP) comme modèle de la couche hydratée [Brown *et al.* 1984]. Cette modélisation suggère une interaction d'une molécule de tiludronate avec deux calcium de la surface de l'OCP. Le mécanisme d'adsorption envisagé est une adsorption en deux étapes avec fixation des groupements phosphonates sur les ions calcium de la surface associée à une déprotonation de la molécule et à une restructuration de la surface combinée à l'élimination d'ions phosphate ayant capté ces protons. Ce mécanisme supposé implique que l'adsorption et la libération de phosphate sont deux évènements connexes cependant il paraît difficile d'expliquer les raisons de la différence de comportement entre les différentes apatites nanocristallines. Cette étude montre également que l'utilisation d'apatites nanocristallines de synthèse comme modèles permet une approche beaucoup plus fine et détaillée de la réactivité des minéraux osseux que l'utilisation

plus traditionnelle d'hydroxyapatite stœchiométrique, même si les systèmes sont nécessairement plus complexes.

Par ailleurs, une caractérisation complète des supports et la réalisation de tests d'incubation préliminaires aux tests *in vitro* permettent de mettre en évidence le caractère évolutif des apatites nanocristallines biomimétiques au contact d'un milieu biologique exempt de cellule et les disparités existantes entre les supports afin d'appréhender leurs comportements en présence des cellules.

L'étude de l'activité des cellules osseuses sur des supports mis en forme à partir des apatites nanocristallines précédemment synthétisées met en lumière :

- le rôle du substrat sur la réponse des cellules HOP et HBMSC et les ostéoclastes murins. Ils mettent également en évidence l'évolution du support dans un environnement biologique contenant les cellules osseuses. Bien que la dynamique de ces apatites nanocristallines non stœchiométriques, contrairement aux supports classiques utilisés généralement dans les études de culture cellulaire telle que l'hydroxyapatite soit difficile à appréhender, ce paramètre ne doit pas être négligé si on souhaite approcher la complexité du comportement du tissu osseux.
- l'influence sur la réponse des cellules osseuses (HOP, HBMSC et ostéoclastes murins) des molécules de tiludronate adsorbées sur différents modèles osseux. La présence du tiludronate favorise l'étalement et la prolifération des cellules HOP et HBMSC aussi bien sur des analogues au minéral osseux jeune que mature. De plus elle engendre la diminution des lacunes de résorption en surface. Ces résultats mettent donc en évidence l'action directe du tiludronate à la fois sur les ostéoclastes et les ostéoblastes.

Ce travail contribue à une meilleure compréhension des phénomènes d'interaction gouvernant l'adsorption d'une molécule de tiludronate sur des analogues au minéral osseux. Il met en évidence le caractère évolutif des apatites nanocristallines biomimétiques et leur non-cytotoxicité, et montre l'influence de la présence du tiludronate sur les cellules osseuses. Les connaissances ainsi acquises pourraient être mises à profit pour le développement de biomatériaux pour une délivrance locale et contrôlée de bisphosphonates au sein des sites ostéoporotiques. On peut penser assurer une libération lente et contrôlée d'agents d'anti-résorption dans l'organisme à partir de biomatériaux implantables. Biocompatibles et bioactifs, les biomatériaux à base d'apatites nanocristallines peuvent être implantés *in vivo* et

lentement remplacés par de l'os néoformé, libérant le principe actif *in-situ* directement au sein de l'organe et assurant une amélioration locale de la qualité osseuse. Les effets secondaires liés à l'administration par voie systémique seraient ainsi évités, les doses intracorporelles mieux contrôlées et la biodisponibilité favorisée.

Références

Encyclopédies:

Pharmacopée Européenne 6.0 Tome 1, (2008), 2.9.43 Dissolution apparente, 354-355

Vidal (2011)

Merck Index (2006)

Al-Kattan, A. *et al.* (2010). *Medical Potentialities of Biomimetic Apatites through Adsorption, Ionic Substitution, and Mineral/Organic Associations: Three Illustrative Examples*, *Adv Eng Mater.*, **12** (7): B224-B233.

Al Mardini, F. (2008). *Etude de l'adsorption du pesticide Bromacil sur charbon actif en poudre en milieu aqueux Effet compétiteur des matières organiques naturelles*, Ecole supérieure d'ingénieurs de Poitiers, Poitiers.

Alexandre, C. *et al.* (1998). *La maladie osseuse de Paget: diagnostic et stratégie thérapeutique*, John Libbey Eurotext.

Ammann, P. *et al.* (1993). *Effects of the bisphosphonate tiludronate on bone resorption, calcium balance, and bone mineral density*, *Journal of Bone and Mineral Research*, **8** (12): 1491-1498.

Anginot, A. *et al.* (2008). *Ostéoclastes : origine et différenciation*, In: *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, M. C. De Vernejoul et P. Marie, Chap. 2: 10-18.

Aoba, T. (1993). *Formation of calcium phosphates in developing enamel as model of biomineralization*, *Phos Sulf Silic Re Elem*, **76**: 545-548.

Arends, J. *et al.* (1979). *Preparation of pure hydroxyapatite single crystals by hydrothermal recrystallization*, *Journal of Crystal Growth*, **46** (2): 213-220.

Aronov, D. *et al.* (2007). *Hydroxyapatite nanoceramics: Basic physical properties and biointerface modification*, *Journal of the European Ceramic Society*, **27** (13): 4181-4186.

Aronov, D. *et al.* (2006). *Tunable hydroxyapatite wettability: effect on adhesion of biological molecules*, *Process Biochemistry*, **41** (12): 2367-2372.

Autefage, H. (2009 b). *Rôle ostéoinducteur d'un revêtement d'apatite carbonatée nanocristalline sur des céramiques de phosphate de calcium biphasique*, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

Autefage, H. *et al.* (2009 a). *Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate porous ceramics*, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **91B** (2): 706-715.

Azoulay, C. (2004). *Ménopause en 2004: le «traitement hormonal substitutif» n'est plus ce qu'il était*, *La revue de médecine interne.*, **25** (11): 806-815.

Bagory, M. (2006) *La PCR et RT-PCR quantitative temps réel*.

Baig, A. *et al.* (1999). *Metastable equilibrium solubility behavior of bone mineral*, *Calcified Tissue International*, **64** (4): 329-339.

Balas, F. *et al.* (2006). *Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials*, *Journal of the American Chemical Society*, **128** (25): 8116-8117.

Barrias, C. *et al.* (2004). *Adhesion and proliferation of human osteoblastic cells seeded on injectable hydroxyapatite microspheres*, *Key Engineering Materials*, **254**: 877-880.

- Barroug, A. (1989). *Propriétés de surface des apatites et adsorption de protéines* Louvain-la-Neuve, Thèse d'Etat, Université Catholique de Louvain.
- Barroug, A. *et al.* (1997). *Adsorption of Succinylated Lysozyme on Hydroxyapatite*, J Colloid Interface Sci., **189** (1): 37-42.
- Barroug, A. *et al.* (2004). *Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro controlled adsorption and release*, J Orthop Res., **22** (4): 703-708.
- Barroug, A. *et al.* (2008). *Exchange reactions at calcium phosphates surface and applications to biomaterials*, Key Engineering Materials., **361**: 79-82.
- Barroug, A. *et al.* (1989 b). *Lysozyme on apatites: A model of protein adsorption controlled by electrostatic interactions*, Colloids Surf., **37**: 339-355.
- Barroug, A. *et al.* (1998 a). *Adsorption of Catalase on Hydroxyapatite*, J Colloid Interface Sci., **208** (1): 147-152.
- Bartlett, G. R. (1959). *Phosphorus assay in column chromatography*, J. biol. Chem, **234** (3): 466-468.
- Belton, P. S. *et al.* (1988). *Solid-state phosphorus-31 NMR studies of synthetic inorganic calcium phosphates*, Journal of Physics and Chemistry of Solids, **49** (1): 21-27.
- Benaziz, L. *et al.* (2001). *Adsorption of O-Phospho-L-Serine and L-Serine onto Poorly Crystalline Apatite*, J Colloid Interface Sci., **238** (1): 48-53.
- Bigi, A. *et al.* (2009). *Biofunctional alendronate-Hydroxyapatite thin films deposited by matrix assisted pulsed laser evaporation*, Biomaterials, **30** (31): 6168-6177.
- Boanini, E. *et al.* (2007). *Composite nanocrystals provide new insight on alendronate interaction with hydroxyapatite structure*, Advanced Materials, **19** (18): 2499-2502.
- Boanini, E. *et al.* (2011). *The effect of zoledronate-hydroxyapatite nanocomposites on osteoclasts and osteoblast-like cells in vitro*, Biomaterials.
- Boanini, E. *et al.* (2008). *Alendronate-hydroxyapatite nanocomposites and their interaction with osteoclasts and osteoblast-like cells*, Biomaterials, **29** (7): 790-796.
- Bohner, M. *et al.* (1997). *Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system*, Journal of Pharmaceutical Sciences, **86** (5): 565-572.
- Bonel, G. (1972). *Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites* Toulouse, Thèse d'Etat, UPS.
- Bonjour, J. *et al.* (1995). *Tiludronate: bone pharmacology and safety*, Bone, **17** (5): S473-S477.
- Bonnery, M. *et al.* (1994). *Monohydrate of the disodium salt of 4-chlorophenylthiomethylene-bisphosphonic acid, its preparation and pharmaceutical compositions containing it*, EP Patent 0,582,515.
- Brown, W. *et al.* (1984). *Adsorption and Surface Chemistry of Hydroxyapatite*, ed. DN Misra, Plenum Press, New York.
- Cazalbou, S. (2000). *Echanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux*, INP, Toulouse.
- Cazalbou, S. *et al.* (2004). *Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo*, J Bone Miner Metab., **22** (4): 310-317.
- Cazalbou, S. *et al.* (2004 b). *Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium*, Comptes Rendus Palevol., **3** (6-7): 563-572.

- Chapurlat, R. *et al.* (2004). *Nouveaux traitements de l'ostéoporose*, La Revue de médecine interne, **25**: S573-S579.
- Charlot, G. (1974). *Chimie analytique quantitative*, Masson.
- Chow, L. C. *et al.* (2001). *Octacalcium Phosphate* S Karger Ag.
- Clézardin, P. (2002). *The antitumor potential of bisphosphonates*.
- Clézardin, P. *et al.* (2003). *In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates*, Current medicinal chemistry, **10** (2): 173-180.
- Clézardin, P. *et al.* (2000). *Mécanismes d'action des bisphosphonates sur les cellules tumorales et perspectives d'utilisation dans le traitement de l'ostéolyse maligne*, Revue du rhumatisme, **67** (1): 28-36.
- Clunie, G. (2009). *Ostéoporose*, Coll. Médecine en poche.
- Coleman, R. *et al.* (2011). *Zoledronic acid*, Expert Opinion on Drug Safety, **10** (1): 133-145.
- Coleman, R. E. (2008). *Risks and benefits of bisphosphonates*, Br J Cancer, **98** (11): 1736-1740.
- Combes, C. *et al.* (2002). *Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity*, Biomaterials., **23** (13): 2817-2823.
- Compston, J. (2009). *Clinical and therapeutic aspects of osteoporosis*, European journal of radiology, **71** (3): 388-391.
- Costa, P. *et al.* (2001). *Modeling and comparison of dissolution profiles*, European journal of pharmaceutical sciences, **13** (2): 123-133.
- Dash, S. *et al.* (2010). *Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems*, Acta Pol Pharm, **67** (3): 217-223.
- Davi, H. *et al.* (1999). *Disposition of tiludronate (Skelid) in animals*, Xenobiotica, **29** (10): 1017-1031.
- David, P. E. *et al.* (1996). *The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H⁺-ATPase*, Journal of Bone and Mineral Research, **11** (10): 1498-1507.
- De Vernejoul, M. (2000). *Physiopathologie de la perte osseuse et approche pharmacologique des modulateurs sélectifs du récepteur des estrogènes (SERM)*, Revue du rhumatisme, **67**: 7-13.
- Denissen, H. *et al.* (1994). *Ceramic hydroxyapatite implants for the release of bisphosphonate*, Bone and Mineral, **25** (2): 123-134.
- Detsch, R. *et al.* (2008). *Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics*, Acta Biomaterialia, **4** (1): 139-148.
- Drouet, C. *et al.* (2008). *Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically-active ions Mg²⁺ and Sr²⁺: A preamble to the activation of bone repair materials*, Materials Science and Engineering: C, **28** (8): 1544-1550.
- Durig, J. *et al.* (1987). *Spectra and structure of organophosphorus compounds. 32. Infrared and Raman spectra, conformational stability, barriers to internal rotation, vibrational assignment, and normal coordinate analysis of ethyldifluorophosphine*, Journal of Physical Chemistry, **91** (11): 2769-2778.
- Eichert, D. (2001). *Etude de la réactivité de surface d'apatites de synthèse nanocristallines*, INP, Toulouse.

- Eichert, D. *et al.* (2008). *Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization*, Biomaterials Research Advances: 93.
- Elliott, J. C. (1994). *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates* Amsterdam Elsevier.
- Errassifi, F. (2011). *Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques : Applications aux biomatériaux*, Cadi Ayyad
- Errassifi, F. *et al.* (2010). *Adsorption on apatitic calcium phosphates: application to drug delivery*, In: *Advances in Bioceramics and Biotechnologies. Ceramic Transactions*, R. Narayan et J. McKittrick. The American Ceramic Society, New Jersey, (159-174), Chap.: 159-174.
- Errassifi, F. *et al.* (2009). *Adsorption of a bisphosphonate onto apatitic calcium phosphates: Role of surface characteristics*, the third Conference on the Valorization of Phosphates and Phosphorous compounds (COVAPHOS III), Marrakech, Morocco.
- Farley, J. *et al.* (1988). *The anti-bone-resorptive agent calcitonin also acts in vitro to directly increase bone formation and bone cell proliferation*, *Endocrinology*, **123** (1): 159-167.
- Faucheux, C. *et al.* (2009). *Controlled release of bisphosphonate from a calcium phosphate biomaterial inhibits osteoclastic resorption in vitro*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **89** (1): 46-56.
- Fernandez, D. *et al.* (2003). *Alendronate zwitterions bind to calcium cations arranged in columns*, *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, **59** (12): m543-m545.
- Flanagan, A. *et al.* (1991). *Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: Interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone*, *Calcified Tissue International*, **49** (6): 407-415.
- Fleisch, H. (1998). *Bisphosphonates: mechanisms of action*, *Adv Organ Biol.*, **5**: 835-850.
- Fleisch, H. (2000). *Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patient*, Academic Pr.
- Fleisch, H. *et al.* (1968). *The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo*, *Calcified Tissue International*, **2**: 10-10.
- Fleming, G. D. *et al.* (2008). *Theoretical surface-enhanced Raman spectra study of substituted benzenes: I. Density functional theoretical SERS modelling of benzene and benzonitrile*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **71** (3): 1049-1055.
- Fox, J. *et al.* (1995). *Metastable equilibrium solubility distribution and dissolution and dissolution kinetics of carbonate apatite powder*, AmjadZ (ed): *Mineral Scale Formation and Inhibition*. New York, Plenum Press: 231-250.
- Fromigue, O. *et al.* (2002). *Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts*, *Journal of endocrinological investigation*, **25** (6): 539.
- Giudicelli, J. *et al.* (1998). *Le remodelage osseux et l'exploration de l'ostéoporose*, *Revue de l'ACOMEN*, **4** (3).
- Giulietti, A. *et al.* (2001). *An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression*, *Methods*, **25** (4): 386-401.

- Grossmann, G. *et al.* (2000). *Solid-state NMR of bisphosphonates adsorbed on hydroxyapatite*, *Magnetic Resonance in Chemistry.*, **38** (1): 11-16.
- Guicheux, J. *et al.* (1997). *Apatite as carrier for growth hormone: in vitro characterization of loading and release*, *Journal of Biomedical Materials Research*, **34** (2): 165-170.
- Gustavsson, J. *et al.* (2011). *Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media*, *Acta Biomaterialia*.
- Hamanishi, C. *et al.* (1998). *A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin*, *Journal of Biomedical Materials Research*, **33** (3): 139-143.
- Hina, A. (1996). *Etude de la réactivité, en milieu aqueux, d'apatites phosphocalciques d'intérêt biologique*, Thèse de Doctorat, INP.
- Hing, K. *et al.* (1999). *Effect of Carbonate Content on the Response of Human Osteoblast-like Cells to Carbonate Substitute Hydroxyapatite*, Singapore; World Scientific; 1998.
- Horiba Jobin Yvon *Raman Application Note*, Horiba Jobin Yvon.
- Hott, M. *et al.* (1997). *Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite*, *Journal of Biomedical Materials Research*, **37** (4): 508-516.
- Houillier, P. (2008). *Métabolisme du calcium et du phosphate*, In: *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, M. C. De Vernejoul et P. Marie, Chap. 9: 77-82.
- Hughes, D. *et al.* (1989). *Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow*, *Journal of Clinical Investigation*, **83** (6): 1930.
- Im, G. I. *et al.* (2004). *Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates*, *Biomaterials*, **25** (18): 4105-4115.
- Ironside, M. S. *et al.* (2010). *Bisphosphonate protonation states, conformations, and dynamics on bone mineral probed by solid-state NMR without isotope enrichment*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **76** (1): 120-126.
- Jäger, C. *et al.* (2006). *A solid state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite*, *Magn Reso Chem.*, **44** (6): 573-580.
- Ji, W. *et al.* (2012). *Local delivery of small and large biomolecules in craniomaxillofacial bone*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64** (12): 1152-1164.
- Jiang, Y. *et al.* (2003). *Recombinant human parathyroid hormone (1-34)[teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure*, *Journal of Bone and Mineral Research*, **18** (11): 1932-1941.
- Johnell, O. *et al.* (2006). *An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures*, *Osteoporosis International*, **17** (12): 1726-1733.
- Josse, S. *et al.* (2005). *Novel biomaterials for bisphosphonate delivery*, *Biomaterials.*, **26** (14): 2073-2080.
- Juillard, A. *et al.* (2010). *Molecular interactions between zoledronic acid and bone: An in vitro Raman microspectroscopic study*, *Bone*, **47** (5): 895-904.
- Julien, M. *et al.* (2007). *Physico-chemical-mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates*, *Biomaterials*, **28** (6): 956-965.

- Kandori, K. *et al.* (2002). *Study on the particle texture dependence of protein adsorption by using synthetic micrometer-sized calcium hydroxyapatite particles*, Colloids Surf B: Biointerfaces., **24** (2): 145-153.
- Kandori, K. *et al.* (2005). *Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements*, Calcified Tissue International, **76** (3): 194-206.
- Kandori, K. *et al.* (1995 c). *Adsorption of protein on non-stoichiometric calcium--strontium hydroxyapatite*, Colloids Surf A: Phys chem Eng Asp., **94** (2-3): 225-230.
- Kandori, K. *et al.* (1995 b). *Adsorption of Bovine Serum Albumin on Synthetic Carbonate Calcium Hydroxyapatite*, J Colloid Interface Sci., **174** (1): 124-129.
- Kandori, K. *et al.* (1992). *Adsorption of albumin on calcium hydroxylapatite*, Colloids Surf., **68** (4): 283-289.
- Kandori, K. *et al.* (1995 a). *Adsorption of bovine serum albumin onto synthetic calcium hydroxyapatite: influence of particle texture*, Colloids Surf B: Biointerfaces., **5** (1-2): 81-87.
- Kandori, K. *et al.* (1993). *Absorption of bovine serum albumin on synthesized non-stoichiometric strontium hydroxyapatites*, Colloids surf A., **80** (2-3): 287-291.
- Kay, M. *et al.* (1964). *Crystal structure of hydroxyapatite*, Nature, **204**: 1050.
- Khosla, S. (2010). *Update in male osteoporosis*, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, **95** (1): 3-10.
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histologie et biologie cellulaire: une introduction à l'anatomie pathologique*, De Boeck Université.
- Kim, C. W. *et al.* (2010). *In situ fabrication of alendronate-loaded calcium phosphate microspheres: Controlled release for inhibition of osteoclastogenesis*, Journal of Controlled Release, **147** (1): 45-53.
- Kim, H. M. *et al.* (2001). *Dissolution of poorly crystalline apatite crystals by osteoclasts determined on artificial thin-film apatite*, J Biomed Mater Res, **56** (2): 250-256.
- Kim, H. M. *et al.* (1995). *Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-methods at low temperature*, Journal of Bone and Mineral Research, **10** (10): 1589-1601.
- Kuhn, L. T. *et al.* (2008). *A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages*, Calcif Tissue Int., **83** (2): 146-154.
- Lahann, J. *et al.* (2005). *Smart materials with dynamically controllable surfaces*, MRS Bulletin, **30** (03): 185-188.
- Landi, E. *et al.* (2005). *Synthetic biomimetic nanostructured hydroxyapatite*, Key Engineering Materials, **284**: 949-952.
- Landis, W. (1995). *The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix*, Bone, **16** (5): 533-544.
- Landis, W. *et al.* (1984). *X-ray photoelectron spectroscopy applied to gold-decorated mineral standards of biological interest*, Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films, **2** (2): 1108-1111.

- Langmuir, I. (1918). *The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum*, Journal of the American Chemical Society, **40** (9): 1361-1403.
- Lawson, M. *et al.* (2010). *Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite*, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, **92** (1): 149-155.
- Le Neindre, B. (1993). *Tensions superficielles et interfaciales*, Ed. Techniques Ingénieur.
- LeGeros, R. Z. (1981). *Apatites in biological systems*, Prog Crystal Growth Charact., **4**: 1-45.
- LeGeros, R. Z. (1991). *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, In: *Monographs in oral Science*, H. M. Myers. London, Karger S., Chap.
- LeGeros, R. Z. *et al.* (1995). *Synergistic effects of magnesium and carbonate on properties of biological and synthetic apatites*, Connective Tissue Research, **33** (1-3): 203-209.
- LeGeros, R. Z. *et al.* (1984). *Phosphate minerals in human tissues*, Phosphate minerals: 351-385.
- Legros, R. (1984). *Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés*, Thèse, INP.
- Legros, R. *et al.* (1986). *Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone*, Journal of chemical research. Synopses., **1**: 8-9.
- Libouban, H. (2008). *Remodelage osseux*, In: *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, M. C. Vernejoul et P. Marie, Chap. 1: 3-8.
- Lin, L. *et al.* (2009). *Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, **89** (2): 326-335.
- Luo, E. *et al.* (2008). *Osteoblast adhesion to clodronate-hydroxyapatite composite*, Applied Surface Science, **255** (2): 308-311.
- Malaise, O. *et al.* (2008). *Traitements non hormonaux de l'ostéoporose postménopausique*, Gynécologie Obstétrique & Fertilité, **36** (7): 815-822.
- Malaval, L. (2008). *Matrice osseuse*, In: *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, M. C. De Vernejoul et P. Marie, Chap. 4: 30-38.
- Malghem, J. *et al.* (2005). *Maladie de Paget*, EMC-Radiologie, **2** (3): 288-310.
- Manson, J. A. E. *et al.* (2003). *Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease*, New England Journal of Medicine, **349** (6): 523-534.
- Marie, P. (2008). *Ostéoblastes : origine et différenciation*, In: *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, M. C. De Vernejoul et P. Marie, Chap. 3: 21-26.
- Martin, C. (2009). *Rôle de la signalisation Sphingosine kinase-1 Sphingosine 1-Phosphate dans les interactions stroma-cellules épithéliales au sein des métastases osseuses du cancer de la prostate*, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Mavropoulos, E. *et al.* (2011). *Adsorption and bioactivity studies of albumin onto hydroxyapatite surface*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **83** (1): 1-9.
- Mazières, B. (2002). *Guide pratique de rhumatologie*, Mmi.
- McClung, M. *et al.* (1995). *Tiludronate therapy for Paget's disease of bone*, Bone, **17** (5): S493-S496.

- McClung, M. R. *et al.* (2006). *Denosumab in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density*, New England Journal of Medicine, **354** (8): 821-831.
- McLeod, K. *et al.* (2006). *XPS and bioactivity study of the bisphosphonate pamidronate adsorbed onto plasma sprayed hydroxyapatite coatings*, Applied Surface Science, **253** (5): 2644-2651.
- Menbaoui, A. *et al.* (2004). *Interaction de l'héparine avec des phosphates de calcium biologiques*, Covaphos I, Marrocco, Marrakech.
- Meunier, P. J. (2005 a). *L'ostéoporose*, Elsevier Masson.
- Meunier, P. J. (2005 b). *Introduction: les défis épidémiologiques et thérapeutiques de l'ostéoporose*, Revue du rhumatisme, **72**: S1-S3.
- Meunier, P. J. *et al.* (2004). *The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis*, New England Journal of Medicine, **350** (5): 459-468.
- Midy, V. *et al.* (2001 a). *Evaluation of the effect of three calcium phosphate powders on osteoblast cells*, J Mater Sci: Mater Med., **12** (3): 259-265.
- Midy, V. *et al.* (2001 b). *Adsorption of vascular endothelial growth factor to two different apatitic materials and its release*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, **12** (4): 293-298.
- Midy, V. *et al.* (1998). *Basic fibroblast growth factor adsorption and release properties of calcium phosphate*, J Biomed Mater Res., **41** (3): 405-411.
- Montrejaud, M. (1973). *Contribution à l'étude des phospho-apatites oxygénées*,
- Mosmann, T. (1983). *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, Journal of immunological methods, **65** (1-2): 55-63.
- Mukherjee, S. *et al.* (2009). *Thermodynamics of bisphosphonates binding to human bone: a two-site model*, J Am Chem Soc., **131** (24): 8374-8375.
- Mukherjee, S. *et al.* (2008). *NMR investigations of the static and dynamic structures of bisphosphonates on human bone: A molecular model*, J Am Chem Soc., **130** (4): 1264-1273.
- Murakami, H. *et al.* (1994). *Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia of growing rats after sciatic neurectomy*, Journal of Bone and Mineral Research, **9** (9): 1355-1364.
- Murakami, H. *et al.* (1995). *A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders*, Bone, **17** (2): 137-144.
- Nakamura, M. *et al.* (2010). *Enhanced osteoblastic adhesion through improved wettability on polarized hydroxyapatite*, Journal of the Ceramic Society of Japan, **118** (1378): 474-478.
- Nancollas, G. H. *et al.* (2006). *Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite*, Bone., **38** (5): 617-627.
- Neuman, W. *et al.* (1968). *The cycling concept of exchange in bone*, Calcified Tissue International, **2** (1): 262-270.

- Neves, M. *et al.* (2002). *Synthesis, characterization and biodistribution of bisphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies*, Nucl Med Biol, **29** (3): 329-338.
- Nishikawa, M. *et al.* (1996). *Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures*, Bone, **18** (1): 9-14.
- Obadia, L. *et al.* (2003). *Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin*, Biomaterials, **24** (7): 1265-1270.
- Ochiuz, L. *et al.* (2010). *Investigations on the in vitro release mechanism of sodium alendronate from hydrophilic matrix tablets* Farmacia, **58** (6): 795-805.
- Ohnishi, H. *et al.* (1997). *Bisphosphonate tiludronate increases bone strength by improving mass and structure in established osteopenia after ovariectomy in rats*, Bone, **21** (4): 335-343.
- OMS (1994). *Evaluation du risque de fracture et son application au dépistage de l'ostéoporose post-ménopausique*. Genève, Organisme mondiale de la Santé. **843**.
- Ong, H. T. *et al.* (2008). *Exploiting the high-affinity phosphonate-hydroxyapatite nanoparticle interaction for delivery of radiation and drugs*, Journal of Nanoparticle Research, **10** (1): 141-150.
- Orcel, P. (2005). *Ostéoporose post-ménopausique: traiter aujourd'hui et demain*, Revue du rhumatisme, **72**: S10-S15.
- Orcel, P. *et al.* (2002). *Les bisphosphonates en dehors de l'ostéoporose*, Revue du rhumatisme, **69** (1): 20-29.
- Ouizat, S. *et al.* (1999). *Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence of maturation*, Mater Res Bull., **34** (14-15): 2279-2289.
- Palazzo, B. *et al.* (2007). *Biomimetic Hydroxyapatite-Drug Nanocrystals as Potential Bone Substitutes with Antitumor Drug Delivery Properties*, Adv Func Mater., **17** (13): 2180-2188.
- Panzavolta, S. *et al.* (2009). *Alendronate and Pamidronate calcium phosphate bone cements: setting properties and in vitro response of osteoblast and osteoclast cells*, J Inorg Biochem, **103** (1): 101-106.
- Penel, G. *et al.* (1998). *MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites*, Calcif Tissue Int., **63** (6): 475-481.
- Peter, B. *et al.* (2005). *Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration*, Bone, **36** (1): 52-60.
- Pieters, I. Y. *et al.* (2010). *Carbonated apatites obtained by the hydrolysis of monetite: Influence of carbonate content on adhesion and proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells*, Acta Biomaterialia, **6** (4): 1561-1568.
- Poircuitte, G., J., G. (2004). *Le tiludronate: mode d'action et utilisation thérapeutique dans l'espèce équine en pathologie locomotrice*, Faculté de médecine de Créteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- Posner, A. S. (1969). *Crystal chemistry of bone mineral*, Physiological reviews, **49** (4): 760-792.

- Pritzkow, W. *et al.* (1985). *Structure refinement with X-ray powder diffraction data for synthetic calcium hydroxyapatite by Rietveld method*, Crystal Research and Technology, **20** (7): 957-960.
- Queiroz, A. *et al.* (2001). *Adsorption and release studies of sodium ampicillin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites*, Biomaterials, **22** (11): 1393-1400.
- Redey, S. *et al.* (1999). *Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies*, Journal of Biomedical Materials Research, **45** (2): 140-147.
- Redey, S. A. *et al.* (2000). *Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: Role of surface energy*, Journal of Biomedical Materials Research, **50** (3): 353-364.
- Redey, S. A. *et al.* (1999). *Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: Relationship to surface energies*, Journal of Biomedical Materials Research, **45** (2): 140-147.
- Reginster, J. Y. *et al.* (1988). *Biological and clinical assessment of a new bisphosphonate, (chloro-4 phenyl) thiomethylene bisphosphonate, in the treatment of Paget's disease of bone*, Bone, **9** (6): 349-354.
- Reinholz, G. G. *et al.* (2000). *Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts*, Cancer research, **60** (21): 6001.
- Rey, C. (1984). *Etude des relations entre apatites et composés moléculaires*, INP,
- Rey, C. *et al.* (2007). *Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties*, Materialwissenschaft und Werkstofftechnik., **38** (12): 996-1002.
- Rey, C. *et al.* (2007 b). *Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials*, Materials Sci Eng C., **27** (2): 198-205.
- Rey, C. *et al.* (1995). *Maturation of poorly crystalline apatites: Chemical and structural aspects in vivo and in vitro*, Cells Mater., **5** (4): 345-356.
- Rey, C. *et al.* (1989). *Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states*, Connective Tissue Research., **21** (1): 267-273.
- Rey, C. *et al.* (1991). *A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃²⁻ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation*, Calcified Tissue International, **49** (4): 259-268.
- Rey, C. *et al.* (1990). *Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: I Investigations in the v₄ PO₄ domain*, Calcified Tissue International. (46): 384-394.
- Rey, C. *et al.* (1978). *Some features of the incorporation of oxygen in different oxidation states in the apatitic lattice: Synthesis and properties of some oxygenated apatites*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry., **40** (1): 27-30.
- Rill, C. *et al.* (2009). *Kinetics and thermodynamics of adsorption on hydroxyapatite of the [¹⁶⁰Tb]Terbium complexes of the bone-targeting ligands DOTP and BPPED*, Langmuir., **25** (4): 2294-2301.

- Robinson, J. *et al.* (2006). *Modelling the interaction of several bisphosphonates with hydroxyapatite using the generalised AMBER force field*, Journal of Molecular Structure, **825** (1-3): 134-142.
- Rodrigues, A. (1998). *Comportement d'orthophosphates de calcium amorphes ou cristallisés en présence d'eau* Sciences des matériaux, INP.
- Rohanizadeh, R. *et al.* (2000). *Ultrastructural properties of bone mineral of control and tiludronate-treated osteoporotic rat*, Calcified Tissue International, **67** (4): 330-336.
- Rossouw, J. *et al.* (2002). *Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial*, Jama, **288** (3): 321-333.
- Rouahi, M. *et al.* (2006). *Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials*, Biomaterials, **27** (14): 2829-2844.
- Roussière, H. *et al.* (2008). *Reaction of Zoledronate with β -Tricalcium Phosphate for the Design of Potential Drug Device Combined Systems*, Chem Mater., **20** (1): 182-191.
- Roussière, H. *et al.* (2005). *Hybrid materials applied to biotechnologies: coating of calcium phosphates for the design of implants active against bone resorption disorders*, J Mater Chem., **15** (35-36): 3869-3875.
- Russell, R. G. G. (2007). *Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology*, Pediatrics., **119** (Supplement_2): S150-162.
- Russell, R. G. G. *et al.* (1970). *The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats*, Calcif Tissue Res., **6** (3): 183-196.
- Sahni, M. *et al.* (1993). *Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts*, Journal of Clinical Investigation, **91** (5): 2004.
- Saltel, F. *et al.* (2004). *Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts*, Molecular biology of the cell, **15** (12): 5231-5241.
- Sauer, G. *et al.* (1994). *Fourier transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates*, Calcified Tissue International, **54** (5): 414-420.
- Scherrer, P. (1918). *Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen*, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen **26** 98-100.
- Schnitzler, V. *et al.* (2011). *Investigation of alendronate-doped apatitic cements as a potential technology for the prevention of osteoporotic hip fractures: critical influence of the drug introduction mode on the in vitro cement properties*, Acta Biomaterialia, **7** (2): 759-770.
- Schwartz, Z. *et al.* (1994). *Underlying mechanisms at the bone–biomaterial interface*, Journal of Cellular Biochemistry, **56** (3): 340-347.
- Seshima, H. *et al.* (2006). *Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules*, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials., **78** (2): 215-221.
- Shi, X. *et al.* (2009). *Enhancing alendronate release from a novel PLGA/hydroxyapatite microspheric system for bone repairing applications*, Pharmaceutical research, **26** (2): 422-430.

- Shinoda, H. *et al.* (1983). *Structure-activity relationships of various bisphosphonates*, *Calcif Tissue Int.*, **35** (1): 87-99.
- Somrani, S. (2010). *Contribution à l'amélioration des propriétés de biomatériaux à base d'orthophosphates de calcium et à base d'un alliage Ni-Cr: Approches physico-chimiques et thermochimiques*, Institut Préparatoire aux études d'ingénieurs de Tunis, Université de Tunis.
- Somrani, S. *et al.* (2005). *Physico-chemical and thermochemical studies of the hydrolytic conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatite*, *Journal of Solid State Chemistry*, **178** (5): 1337-1348.
- Stokes, A. *et al.* (1944). *A method of calculating the integral breadths of Debye-Scherrer lines: generalization to non-cubic crystals*, Cambridge Univ Press.
- Taylor, J. A. *et al.* (1978). *Surface alteration of graphite, graphite monofluoride and teflon by interaction with Ar⁺ and Xe⁺ beams*, *Applications of Surface Science*, **1** (4): 503-514.
- Tortora, G. J. *et al.* (2007). *Principes d'anatomie et de physiologie*, De Boeck.
- Trombe, J. C. (1972). *Contribution à l'étude de la décomposition et la réactivité de certaines apatites hydroxylées carbonatées ou fluorées alcalino-terreuses* Toulouse, Thèse d'Etat, Université Paul Sabatier.
- Uchida, A. *et al.* (1992). *Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic*, *Journal of Orthopaedic Research*, **10** (3): 440-445.
- Van Beek, E. R. *et al.* (2003). *Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates*, *Bone.*, **33** (5): 805-811.
- Vandecandelaere, N. (2012). *Élaboration et caractérisation de biomatériaux osseux innovants à base d'apatites phospho-calciques dopées*, INP Toulouse, université de toulouse.
- Vignoles, M. M. (1984). *Contribution à l'étude des apatites carbonatées de type B* Toulouse, Thèse d'Etat, INP.
- Vilamitjana-Amedee, J. *et al.* (1993). *Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **29** (9): 699-707.
- Von Knoch, F. *et al.* (2005). *Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells*, *Biomaterials*, **26** (34): 6941-6949.
- Wang, Y. (2012). *Elaboration de modèles collagène/apatite pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux*, Université Pierre et Marie Curie.
- Williamson, G. *et al.* (1953). *X-ray line broadening from fcc aluminium and wolfram*, *Acta Metallurgica*, **1** (1): 22-31.
- Wilson, C. J. *et al.* (2005). *Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review*, *Tissue engineering*, **11** (1-2): 1-18.
- Wu, Y. *et al.* (2003). *Phosphate ions in bone: identification of a calcium-organic phosphate complex by 31P solid-state NMR spectroscopy at early stages of mineralization*, *Calcif Tissue Int.*, **72** (5): 610-626.

- Yamada, S. *et al.* (1997). *Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios*, *Biomaterials*, **18** (15): 1037-1041.
- Yesinowski, J. P. *et al.* (1987). *Hydrogen environments in calcium phosphates: proton MAS NMR at high spinning speeds*, *Journal of the American Chemical Society*, **109** (21): 6274-6282.
- Young, A. (1973). *Colloques Internationaux CNRS No. 230: Physico-Chimie et Cristallographie des Apatites d'Intérêt Biologique (Paris)*, CNRS, Paris.
- Yuasa, T. *et al.* (2004). *Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro*, *Biomaterials*, **25** (7): 1159-1166.

Annexes

I. Caractérisation physico chimique

1. Analyses chimiques

1.1 Dosage du calcium et phosphore dans le solide

Une même solution mère est préparée pour le dosage des ions calcium et phosphate dans un solide. Cette solution mère de 100mL est constituée de 100 mg de solide dissout dans 1 mL d'une solution d'acide perchlorique (6M) puis complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau désionisée dans une fiole de 100mL.

Dosage des ions calcium

Les ions calcium sont dosés par volumétrie en retour [Charlot 1974]. L'agent complexant est le sel disodique de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) en présence d'ammoniaque. L'excès d'EDTA est dosé par une solution titrée de chlorure de zinc. L'indicateur de virage utilisé est le noir d'ériochrome (NET). Le virage est observé par changement de la coloration bleue à rose. L'incertitude sur la teneur en calcium est de l'ordre de 0,5% massique.

Dosage des ions phosphate

Les ions phosphate sont dosés par colorimétrie [Charlot 1974]. Cette méthode consiste à mesurer la densité optique (absorbance) de la coloration jaune d'un complexe phosphovanadomolybdique $\text{VO}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ en milieu acide à $\lambda = 460 \text{ nm}$. Le réactif colorimétrique est préparé par mélange d'une solution de molybdate d'ammonium (80 g/L) et d'une solution de monovanadate d'ammonium (4 g/L) dans les proportions 50/50 en volume. Les absorbances des différentes solutions sont mesurées dans des cuves en quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible *Hitachi U-1100* à simple faisceau. L'erreur relative du dosage du phosphore est de l'ordre de 0,5%.

1.2 Dosage du carbonate dans le solide

La quantité d'ions carbonate présents dans les apatites a été déterminée par coulométrie à l'aide d'un coulomètre *UIC Inc. CM 5014*. Une certaine masse de poudre est placée dans un récipient parcouru par un courant d'air exempt de CO_2 . La poudre est ensuite dissoute par ajout d'acide perchlorique (6M). Le CO_2 libéré par l'attaque acide est injecté dans une cellule coulométrique contenant une solution cathodique d'éthanolamine et un indicateur coulométrique de pH. Le CO_2 réagit avec l'éthanolamine pour former un acide titrable provoquant l'atténuation de la couleur bleue de la solution. Une cellule photométrique mesure la diminution de densité optique générée par cette décoloration et initie une

génération électrochimique ramenant la solution à sa coloration initiale (100% transmission). La quantité de courant nécessaire à cette opération est intégrée et transformée en mg de carbone. Le pourcentage massique de CO_3 est alors déterminé à l'aide de la relation suivante :

$$\%m \text{CO}_3^{2-} = (0,5 \times C) / m \times 100$$

Avec: - C (mg): quantité de carbone lu,
- m (mg) : masse de l'échantillon introduit

2. Analyses spectroscopiques

2.1 Diffraction des rayons X (DRX)

L'analyse des échantillons a été réalisée à l'aide d'un diffractomètre *SEIFERT* modèle *3000TT* par exposition au rayonnement $\text{K}\alpha$ émis par une anticathode au cuivre ($\lambda_{\text{K}\alpha_{1\text{Cu}}}=1,540598 \text{ \AA}$). Le diffractomètre a été utilisé en configuration θ - 2θ avec une gamme de 2θ allant de 15° à 80° avec un pas de $0,04^\circ$ et en configuration d'angle rasant avec différentes valeurs de Ω (2° et 4°) pour différentes gammes mais avec le même pas.

2.2. Spectroscopie infrarouge (FTIR)

La poudre a été broyée dans un mortier en agate puis mélangée au KBr en proportion : 2 mg de poudre pour 300 mg de KBr et ensuite comprimée dans une matrice par pressage uniaxial avec une pression de 8 tonnes.

Les spectres infrarouge ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre FTIR *Perkin Elmer*, modèle *Nicolet 5700*. La gamme spectrale est comprise entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution 4 cm^{-1} et 64 scans d'acquisition.

Décomposition mathématique

La décomposition permet de distinguer les différentes composantes contribuant au spectre original. La détermination de l'aire, de l'intensité, de la largeur et de la position des bandes permet de qualifier les spectres. Notons toutefois, que cette technique reste aléatoire puisque que plusieurs solutions existent pour reformer l'enveloppe originale. Des paramètres tels que la position et la largeur de certaines bandes ont donc été fixés en se basant sur les précédents travaux. Les traitements de décomposition mathématique ont été faits à l'aide du logiciel *Grams/386, Galactica*.

2.3. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique complémentaire de la spectroscopie infrarouge. Les deux processus d'interaction à l'origine de l'effet Raman et de l'infrarouge sont différents engendrant une activation de certaines vibrations en Raman et/ou en FTIR. La spectroscopie infrarouge agit sur les mouvements moléculaires tandis que la spectroscopie Raman agit sur la polarisabilité des molécules. En spectroscopie Raman, les nuages électroniques de la molécule vont se déformer sous l'effet d'un champ électrique apporté par le laser en créant un moment dipolaire induit dépendant du champ électrique appliqué, de la nature du nuage déformé et donc de l'espèce impactée. Cette technique spectroscopique permet une caractérisation de l'ordre structural (à courte, moyenne ou grande distance), du type de liaison d'un composé et de la structure cristalline.

Toutes les acquisitions des spectres Raman, y compris celles pour la quantification de BP (chap. 1 § I.5.3), ont été réalisées à l'aide d'un spectroscope Raman *labRAM HR 800 Horiba Jobin Yvon* muni d'un laser rouge ($\lambda=632$ nm), d'un réseau 1800 tr/min, d'un objectif x100, d'un trou à 100 μ m et sans filtre. La gamme spectrale utilisée lors de l'acquisition est : 350-1750 cm^{-1} avec un temps d'exposition de 120 secondes et 3 accumulations.

2.4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide

La RMN est une technique d'analyse chimique utilisée pour déterminer la composition moléculaire. L'environnement chimique des atomes est étudié par mesure de la fréquence de résonance des spins nucléaires de certains noyaux atomiques lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique intense. Ces informations permettent l'identification de molécules et la détermination de leur structure notamment.

Les spectres RMN MAS ^1H et ^{31}P ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER Avance 400 (9,4 T) opérant à 399.60 MHz pour ^1H et 161.76 MHz pour ^{31}P . Les références des déplacements chimiques sont le tétraméthylsilane (TMS) pour les noyaux ^1H et une solution de 85% H_3PO_4 pour les noyaux ^{31}P (références externes). Les échantillons ont été placés dans des rotors en zircone de 4 mm tournant à 10 kHz. Les expériences ont été effectuées à la température ambiante de 21°C.

Les spectres ^1H ont été obtenus avec 16 acquisitions et un délai de recyclage de 5 s (rotation de 30°). Les spectres ^{31}P ont été obtenus soit par polarisation directe (rotation de 30°) avec un délai de recyclage de 20 s soit par CP entre le ^1H et le ^{31}P (temps de recyclage de 5 s et temps

de contact de 3 ms et de 0.1 ms). Les expériences $1D^{31}P$ ont été réalisées avec découplage du 1H pendant l'acquisition (séquence spinal64, $\gamma B_1/2\pi=83,3$ kHz).

2.5. Spectrométrie photoélectronique X (XPS)/Analyse chimique (ESCA)

Les analyses de spectrométrie photoélectronique X ont été réalisées avec un spectromètre XPS modèle *K alpha de Thermo Scientific*. La source d'excitation est monochromatique, raie Al K α (1486.6 eV). La surface analysée est de 400 μm^2 . Les spectres de photoélectrons sont calibrés en énergie de liaison par rapport à l'énergie de la composante C-C du carbone C1s à 285,0 eV ($\pm 0,1$ eV). Pour chaque échantillon, nous avons procédé à deux points de mesure.

2.6. Spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES)

La spectrométrie par torche à plasma est une méthode physique d'analyse chimique permettant de doser les éléments présents dans un liquide. La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon. Les électrons des atomes ionisés émettent un photon lorsqu'ils retournent à l'état fondamental dont l'énergie est caractéristique de l'élément. La lumière émise par le plasma est alors analysée par des monochromateurs et son intensité est comparée à celle émise par le même élément contenu dans un étalon. Le tracé d'une droite d'étalonnage en début d'analyse est donc nécessaire.

Les analyses des éléments Ca et P dans une matrice à base d'eau désionisée et de milieu biologique complexe ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre ICP AES *Ultima 2 Horiba Jobin Yvon* à réseau holographique 2400 traits/mn, équipé d'un générateur réfrigéré. L'introduction des échantillons a lieu par un nébuliseur *Miramist REF 47929024* débit 1mL/min acceptant des charges jusqu'à 300g/L

Les analyses des éléments Ca et P dans la matrice à base d'eau ultrapure (type milliQ) utilisés lors des tests de libération ont, quant à elles, été réalisées à l'aide d'un spectromètre ICP-AES *IRIS Intrepid II XDL, Thermo Electron Corp.*

3. Microscopie

3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)/ Analyse chimique (EDS)

La caractérisation morphologique et microstructurale des poudres a été réalisée par microscopie électronique à balayage, à l'aide d'un microscope électronique à balayage *LEO-435VP*. Les échantillons ont été préalablement métallisés à l'argent pour rendre les échantillons conducteurs. Ce microscope électronique en balayage est équipé d'un analyseur

IMIX-PC EDS (PGT) à diode de germanium. L'analyse EDS a été utilisée pour déterminer les éléments présents en surface des cristaux.

3.2. Microscopie en transmission (MET)

Les examens des poudres par microscopie électronique en transmission (MET) ont été réalisés à l'aide d'un microscope *JEOL JEM 2100F*. En vue de l'observation des cristaux, une petite quantité de poudre a été dispersée par ultrasons dans solution d'éthanol. Une goutte de cette suspension est ensuite déposée sur une grille de cuivre recouverte de Formvar contenant du carbone pour rendre les échantillons conducteurs.

4. Analyses physiques

4.1. Porosimétrie à mercure

La porosité des pastilles NCA1 et NCA2 a été déterminée par porosimétrie à mercure à l'aide d'un appareil *Micromeritics Autopore III*. Cette technique consiste à mesurer le volume de mercure ayant pénétré dans l'échantillon en fonction de la pression appliquée (correspondant à un diamètre des pores). Ces mesures donnent un profil et le pourcentage de porosité des échantillons. Chaque analyse a nécessité l'utilisation de 9 pastilles.

4.2. Surface spécifique

La surface spécifique a été mesurée par la méthode multipoint Brunauer-Emmett-Teller (BET). Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil *Micromeritics Tristar II 3020*. Cette méthode est basée sur l'adsorption d'un gaz, dans notre cas de l'azote à la surface des échantillons. Les échantillons ont été lyophilisés durant toute une nuit puis immédiatement mis à dégazer pendant une heure à 40°C.

4.3. Granulométrie laser

Les mesures de granulométrie ont été réalisées à l'aide d'un granulomètre de type *Malvern Mastersizer 2000* équipé d'un accessoire de dispersion en voie sèche modèle *Scirocco*. Un faisceau laser issu d'un tube à gaz d'hélium *via* un collimateur est envoyé dans une cellule de mesure où les particules sont maintenues en constante circulation afin que chaque particule passe au moins une fois devant le faisceau laser durant la mesure. Les particules passent à travers le *Scirocco* composé d'une trémie vibrante sur laquelle elles sont déposées. Une alimentation en air comprimé se fait à la sortie de la trémie et crée une dépression entraînant

les particules vers la cellule de mesure. Les particules sont récupérées en fin de circuit par un aspirateur. De manière générale, la granulométrie laser est sensible au volume des particules. Notons que la théorie mathématique admise considère la lumière dispersée par l'échantillon comme des sphères opaques à la lumière.

4.4. Mesure d'angle de contact

Le mouillage est la propriété d'un liquide à s'étaler à la surface d'un corps. Il est caractérisé par l'angle de contact θ entre une goutte de ce liquide et le support solide. Les valeurs de θ informe du caractère mouillant d'un liquide lorsqu'il est déposé sur une surface solide plane en très petite quantité (figure A1) ;

- si $\theta = 0^\circ$, il y a mouillage parfait
- si $\theta < 90^\circ$, il y a mouillage
- si $\theta > 90^\circ$, il y a non mouillage

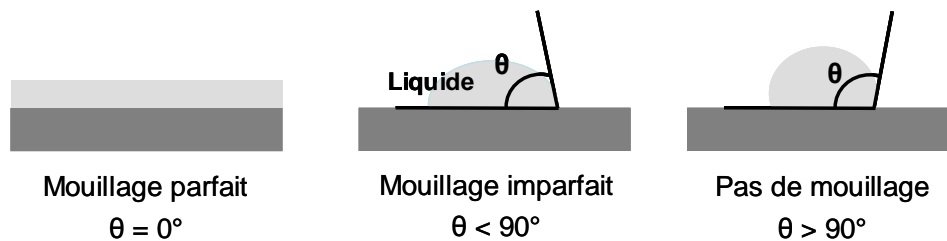


Figure A1: Correspondance entre les valeurs de θ et le caractère mouillant d'un liquide

Les angles de contact sont déterminés par mesure directe à l'aide d'un *Digidrop* (produit par GBX, mesure d'angle de contact, modèle R&D). Les cinétiques sont réalisées à l'aide d'une caméra qui filme, durant quelques minutes, la goutte préalablement déposée automatiquement sur les pastilles à l'aide d'un dépose goutte (figure A2). Les valeurs des angles θ sont ensuite relevées à l'aide du logiciel GBX pour chaque temps d'acquisition. Une seule goutte a été déposée sur chaque pastille lors des essais.

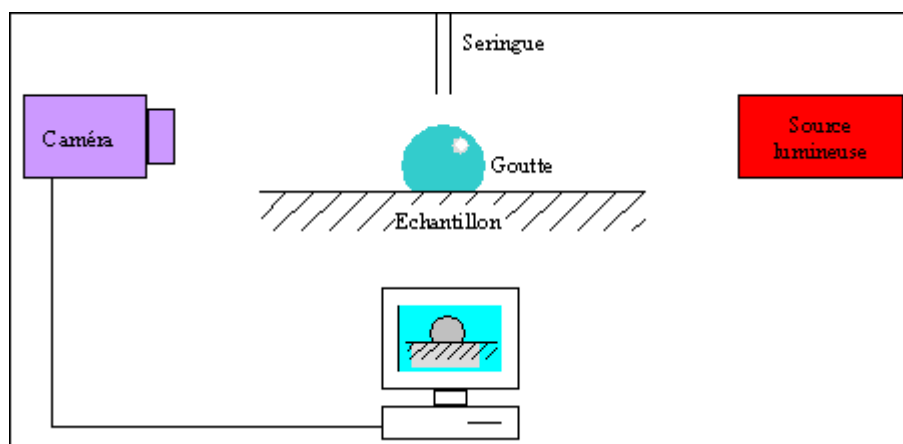


Figure A2: Schéma du montage du *Digidrop*

II. Adsorption

1. Cinétique d'adsorption

Le milieu d'adsorption comportant une solution aqueuse de tiludronate à une concentration de 0,3 g/L diluée dans du KCl (1mM) est préparée et le pH est ajusté au pH physiologique (pH=7,4) par addition de solutions de KOH et/ou HCl. Dans un tube de centrifugation en polyéthylène, 50 mg de poudres d'apatites nanocristallines sont dispersés dans 5 mL de milieu d'adsorption. Les suspensions ainsi obtenues sont placées dans un bain à ultrasons durant quelques minutes. Puis, les tubes sont mis à incuber dans une étuve thermostatée pendant différentes durées (5 à 90 minutes) à la température physiologique ($T=37^{\circ}$) sans agitation, en position couchée afin d'optimiser la surface de contact liquide/solide. Une fois l'incubation réalisée, les suspensions sont centrifugées durant 20min à 5000 tr/min avant d'être filtrées sur millipore (0,2 μ m) en vue d'analyses chimiques élémentaires (dosage des bisphosphonates et des ions calcium et phosphate). Les poudres sont lavées avec de l'eau désionisée, lyophilisées et stockées au congélateur.

2. Isotherme d'adsorption

Le milieu d'adsorption comportant une solution aqueuse de tiludronate à différentes concentrations : 0, 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5g/L diluée dans du KCl (1mM) est préparé et le pH est ajusté au pH physiologique (pH=7,4) par addition de solutions de KOH et/ou HCl. Dans un tube de centrifugation en polyéthylène, 50 mg de poudres d'apatites nanocristallines sont dispersés dans 5 mL de milieu d'adsorption. Les étapes suivantes d'incubation, de centrifugation, de lavage et de lyophilisation sont identiques au mode opératoire utilisé pour la cinétique d'adsorption.

3. Dosage de BP

Le dosage de la concentration en tiludronate dans les milieux après adsorption est un dosage par spectrophotométrie UV à $\lambda=265\text{nm}$ dans des cuves en quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible *Hitachi U-1100* à simple faisceau. Connaissant la concentration initiale en tiludronate dans le milieu (C_i) et la concentration à l'équilibre obtenue grâce à la mesure d'absorbance à $\lambda=265\text{nm}$ (C_{eq}), nous pouvons déterminer la quantité de tiludronate adsorbée par la poudre lors de chaque essai à l'aide de la formule :

$$Q_{ads} = \frac{(C_i - C_{eq})}{m_{poudre}} \times V_{prise} \quad \text{Avec : } V_{prise} = 5 \text{ mL}$$

III. Analyses biologiques

1. *Ostéoblastes*

1.1 *Obtention des cellules*

Les cellules ostéoprogénitrices sont isolées à partir de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (appelées HOP pour Human OsteoProgenitors) suivant la technique développée au laboratoire *Biotis* de Bordeaux depuis de nombreuses années [Vilamitjana-Amedee *et al.* 1993]. L'isolement des cellules se fait par passage successif de la moelle dans des aiguilles 16G, 18G et 21G afin de la dissocier, puis la suspension cellulaire est séparée en 2 fractions égales puis centrifugée et les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de 5×10^5 cellules/cm² soit dans du milieu de α -MEM (Gibco, Invitrogen) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min et 1% (v/v) de pénicilline + streptomycine (PS) permettant ainsi de garder les cellules adhérentes à l'état de cellules mésenchymateuses non différenciées. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours.

L'autre fraction est reprise dans du milieu IMDM (Gibco, Invitrogen) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min et 1% (v/v) de pénicilline + streptomycine (PS) et avec 10^{-8} M de Dexaméthasone afin d'induire les cellules adhérentes vers le lignage ostéoblastique et obtenir les HOP pour Human OsteoProgenitors. Le milieu de culture est renouvelé tous les 4 jours.

La confluence cellulaire est obtenue après 15 jours de culture dans une étuve thermostatée à 37°C sous CO₂. Après détachement des cellules par action de la trypsine, elles sont amplifiées à raison de 2×10^3 cellules/cm² avec le même milieu.

1.2 *Composition du milieu de culture*

La composition du milieu de culture : IMDM Glutamax, *Invitrogen* est présentée en tableau A1.

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75	30	0.4
L-Alanine	89	25	0.281
L-Alanyl-L-Glutamine	203	812	4
L-Arginine hydrochloride	211	84	0.398
L-Asparagine (freebase)	150	28.4	0.189
L-Aspartic acid	133	30	0.226
L-Cystine	313	70	0.224
L-Glutamic Acid	147	75	0.51
L-Histidine hydrochloride-H2O	210	42	0.2
L-Isoleucine	131	105	0.802
L-Leucine	131	105	0.802
L-Lysine hydrochloride	183	146	0.798
L-Methionine	149	30	0.201
L-Phenylalanine	165	66	0.4
L-Proline	115	40	0.348
L-Serine	105	42	0.4
L-Threonine	119	95	0.798
L-Tryptophan	204	16	0.0784
L-Tyrosine disodium salt	225	104	0.462
L-Valine	117	94	0.803
Vitamins			
Biotin	244	0.013	0.0000533
Choline chloride	140	4	0.0286
D-Calcium pantothenate	477	4	0.00839
Folic Acid	441	4	0.00907
Niacinamide	122	4	0.0328
Pyridoxal hydrochloride	204	4	0.0196
Riboflavin	376	0.4	0.00106
Thiamine hydrochloride	337	4	0.0119
Vitamin B12	1355	0.013	0.0000096
i-Inositol	180	7.2	0.04
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl ₂ -2H ₂ O)	111	219	1.97
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ -7H ₂ O)	120	200	1.67
Potassium Chloride (KCl)	75	330	4.4
Potassium Nitrate (KNO ₃)	101	0.076	0.000752
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84	3024	36
Sodium Chloride (NaCl)	58	4500	77.59
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O)	138	141	1.02
Sodium Selenite (Na ₂ SeO ₃ -5H ₂ O)	263	0.017	0.0000646
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	25
HEPES	238	5958	25.03
Phenol Red	376.4	15	0.0399
Sodium Pyruvate	110	110	1

Tableau A1: Composition du milieu de culture des HOP et HBMSC : IMDM Glutamax, *Invitrogen*

1.3 *Coloration au Live/Dead*

La viabilité des cellules a été déterminée à l'aide d'un kit viabilité/cytotoxicité Live/Dead Assay (Molecular Probes, *Invitrogen*) selon le protocole conseillé par le fabricant. La distinction entre les cellules mortes (fluorescence rouge) et les cellules vivantes (fluorescence verte) a lieu par observation des cellules à l'aide d'un microscope à fluorescence. Dans les cellules vivantes, le colorant non fluorescent, l'acétoxyméthyl calcéine (AM) est transformé par l'activité estérase intracellulaire en calcéine⁵ fluorescente verte. L'homodimère-1 d'éthidium (EthD-1) entre dans les cellules dont les membranes sont lésées (cellules mortes) et se lie à l'acide nucléique engendrant une intensification sa fluorescence rouge de 40X. Les observations ont été réalisées avec un microscope inversé à fluorescence (Nikon Diaphot 300).

1.4 *Test au MTT*

Après 24 heures d'incubation des extraits en présence des cellules, les plaques de culture sont retirées de l'incubateur et chaque puits est rincé avec 200µL de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (InVitrogen). La solution mère de MTT est diluée au 1/5 (v/v) dans du milieu sans rouge phénol (InVitrogen). Les biomatériaux sont transférés dans une nouvelle plaque de 24 puits. Le milieu est enlevé et on lave avec une solution de Hank. Ensuite, 500 µL de la solution MTT obtenue sont distribués dans chaque puits. Après 3 heures d'incubation à 37°C sous CO₂, le surnageant est éliminé et les cristaux de formazan sont formés par addition de 500 µl de DMSO (Diméthyl Sulfoxyde Sigma) dans chaque puits. Enfin, 100µl de chaque puits sont placés sur une plaque 96 puits et sont lus rapidement au spectrophotomètre DYNEX MRX (Laboratoire Dynatech) à la longueur d'onde de 540 nm. Les résultats seront exprimés en pourcentage par rapport au témoin qui représente le 100% d'activité métabolique, proportionnel au nombre de cellules vivantes.

1.5 *Isolement de l'ARN*

La méthode d'extraction de l'ARN total (ARNt) utilisée est « la purification de l'ARN sur colonne d'affinité » présenté en figure A3.

⁵ Calcéine : composé fluorescent destiné à être piégé à l'intérieur des liposomes

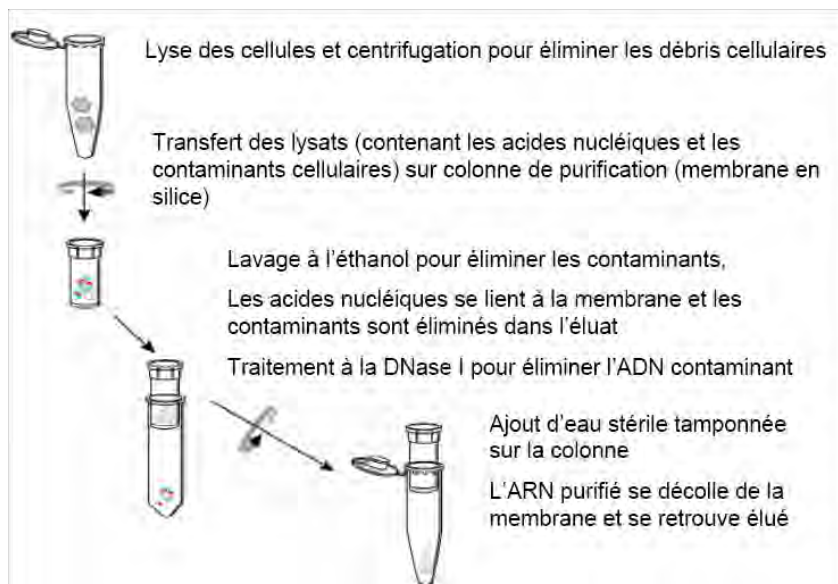


Figure A3:
Protocole de purification
de l'ARNt sur colonne
d'affinité [Poulain 08].

1.6 Synthèse des ADNc à partir des ARN totaux

Pour cette étape, 1 µg d'ARN total est mis à 65°C pendant 5 minutes en présence de 0,5 µg d'oligodT et de l'eau milliQ stérile qsp 20 µl. Le milieu réactionnel contient 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs, de la transcriptase inverse et du tampon spécifique utilisé pour cette dernière. L'échantillon est alors incubé à 42°C pendant 50 minutes minimum pour permettre la synthèse d'ADNc. L'incubation, 15 minutes à 70°C permet l'arrêt de la réaction par l'inactivation de l'enzyme.

1.7 PCR classique

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR classique consiste en une réplication à la chaîne d'une séquence d'ADN par des enzymes, les ADN polymérase [Bagory 2006]. Le ADN-c obtenu par la transcription inverse (RT) permet d'effectuer la PCR. Le ADN-c est analysé par un thermocycleur qui réalise un cycle à 3 étapes, comme schématisé en figure A4.

1) Dénaturation

Cette étape est réalisée à une température comprise entre 94 et 96°C. A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

2) Hybridation (ou Annealing)

L'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires. Cette étape est réalisée à une température comprise entre 50 et 66°C.

3) Elongation (ou Extension des amorces)

Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des

nucléotides. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice. Les enzymes (ou ADN polymérases), quant à elles, vont synthétiser l'ADN. Cette étape est réalisée à une température de 70°C.

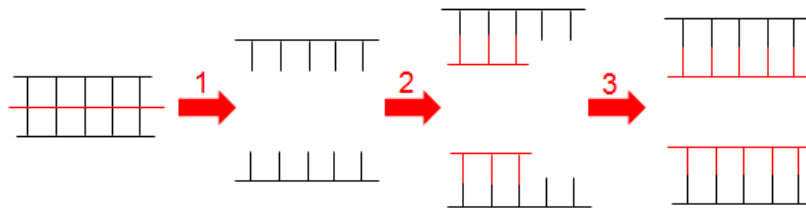


Figure A4: Représentation schématique des trois étapes du cycle de PCR

1.8 PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La PCR quantitative en temps réel est la méthode de choix, utilisée pour quantifier l'expression des ARN messagers d'intérêt, qui sont souvent peu exprimés.

Le principe de la PCR quantitative en temps réel repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule fluorescente capable d'émettre dans des conditions bien définies un rayonnement fluorescent dont l'intensité sera directement mesurée à un moment donné au cours de chaque cycle PCR. L'intensité de la fluorescence émise par la molécule augmente à chaque cycle PCR. Par ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe, de caractériser les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré en un point de la phase exponentielle. Au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la ligne de base de la courbe (*threshold cycle*). Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de PCR entraîne une variation mesurable de l'intensité de la fluorescence émise. Selon l'algorithme utilisé pour son calcul, il est symbolisé par les lettres Ct (*threshold cycle*).

Le système de détection le plus simple repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le SYBR green I (MesaGreen Eurogentec) qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. A chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle PCR, le SYBR Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets. La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR.

Cette méthode n'est applicable que lorsque les rendements de PCR des gènes comparés sont semblables. Le gène choisi comme référence est le gène endogène d'une protéine

ribosomique Po. L'expression de quatre gènes, marqueurs ostéoblastiques, a été étudiée : Oc, Cbfa1, Pal, MMP1 et MMP13.

2. Ostéoclastes

Conditions d'isolement et de culture des cellules

Les cellules sont extraites du tibia et du fémur des deux pattes arrière de la souris (figure A5) puis sont ensuite immergées dans du PBS. La moelle osseuse est prélevée avec une seringue et du milieu de culture (α MEM + antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine) + sérum de veau fœtal (10%) + glutamine (2mM). Les cellules sont dissociées de la moelle puis centrifugées à 2500 tr/min pendant 5 minutes sur un coussin de LSM (*Lymphocyte Separation Medium*) afin de séparer les globules rouges des globules blancs. Cette solution est un milieu de gradient de densité qui permet de séparer les globules rouges des globules blancs (figure A5). L'anneau de globules blancs est récupéré et remis dans du milieu frais puis centrifugé 5 minutes à 1500 tr/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 1mL de milieu complet contenant les cytokines : M-CSF (30ng/mL) et RANKL (30ng/mL). Les cellules sont ensuite énumérées etensemencées à raison de 35000 cellules/puits dans une boîte de 6 puits et incubées à 37°C et 5% CO₂ pendant 3-4 jours, temps durant lequel la différenciation, la prolifération et la fusion sont surveillées. Puis le décollement des ostéoclastes murins est effectué en vue de leur ensemencement sur les supports.

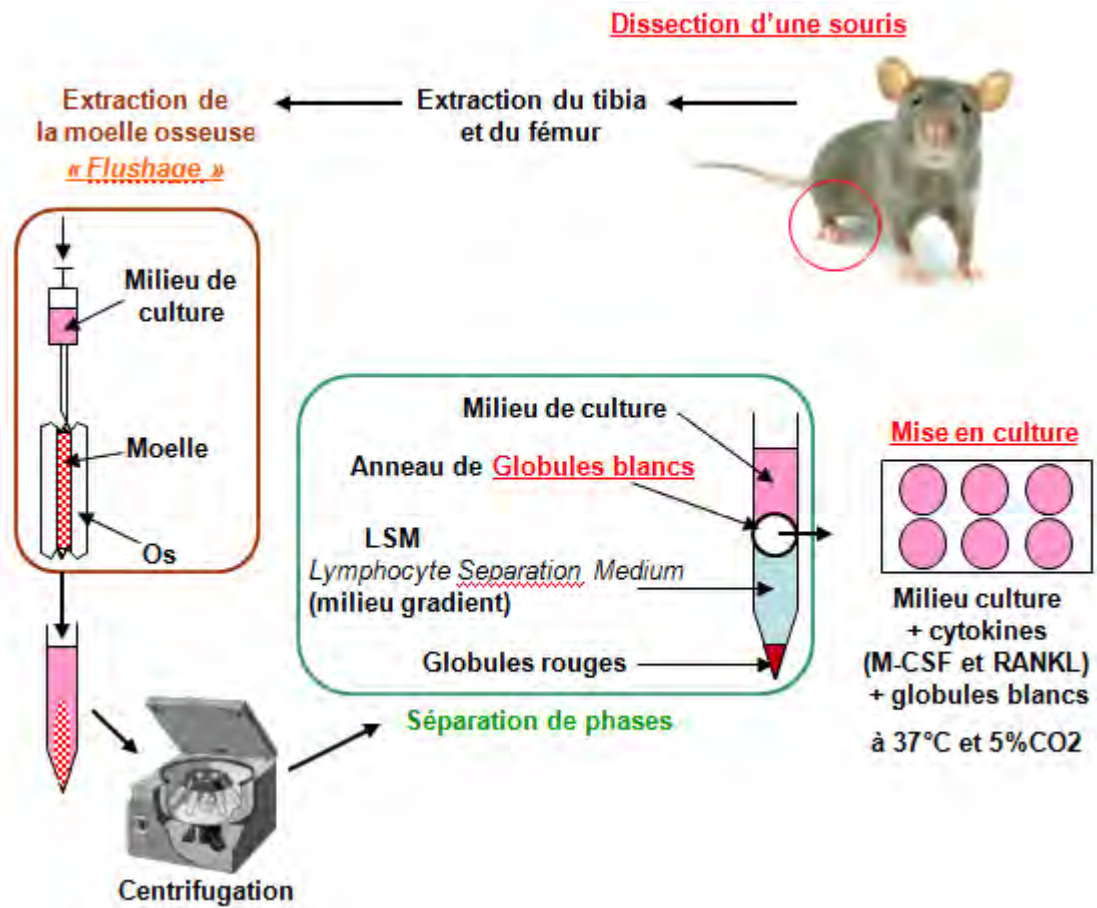


Figure A5: Mode opératoire schématique de l'obtention de cellules issues de la moelle osseuse de souris

AUTEUR : Patricia PASCAUD

TITRE : Apatites nanocristallines biomimétiques comme modèles de la réactivité osseuse : Etude des propriétés d'adsorption et de l'activité cellulaire d'un bisphosphonate, le tiludronate

LABORATOIRE : Institut Carnot CIRIMAT, INP-UPS-UMR CNRS 5085

Ce mémoire porte sur l'étude de l'interaction entre un bisphosphonate, le tiludronate et des phosphates de calcium apatitiques nanocristallins comme modèles du minéral osseux. Les bisphosphonates sont principalement utilisés dans le traitement de maladies impliquant un désordre osseux telles que l'ostéoporose et la maladie de Paget. Cependant peu d'études existent sur le mécanisme d'interaction entre les bisphosphonates et le tissu osseux et les phénomènes présents à l'interface bisphosphonate/minéral osseux restent mal connus. Notre travail a donc consisté à étudier l'interaction entre un bisphosphonate, le tiludronate, et des apatites nanocristallines comme modèle du minéral osseux afin de mieux comprendre les propriétés physico-chimiques et l'activité cellulaire de ce type d'associations. Dans un premier temps, des apatites nanocristallines à différents stades de maturation et à différentes teneurs en carbonates correspondant à des compositions d'os jeune et mature ont été synthétisées et caractérisées. L'adsorption du tiludronate sur ces apatites nanocristallines, la caractérisation des supports après adsorption et les cinétiques de libération du tiludronate ont ensuite été examinées. L'adsorption du tiludronate correspond à un isotherme de type Langmuir. Le processus d'adsorption s'explique globalement par un échange ionique entre les molécules de tiludronate en solution et les ions phosphates présents à la surface de l'apatite. Toutefois la proportion d'ions phosphates libérés par molécule de tiludronate varie suivant les supports. Une modélisation de l'interaction entre le tiludronate et la surface des nanocristaux a été proposée en nous basant sur la littérature et en considérant différents modèles de la surface des nanocristaux. Elle suggère une interaction en deux temps : l'interaction entre les groupements phosphonates de la molécule et deux calcium de la surface suivie d'une déprotonation de la molécule et de l'exclusion d'un nombre variable d'ions phosphate. Dans un deuxième temps, des supports apatitiques avec et sans tiludronate ont été élaborés par pressage uniaxial et caractérisés. L'activité biologique des cellules osseuses de la lignée ostéoblastique (HOP et HBMSC) et ostéoclastique (ostéoclastes murins) au contact des supports a été étudiée. Les résultats montrent que le tiludronate adsorbé stimule la prolifération des ostéoblastes tandis qu'il inhibe la création de lacunes de résorption. La caractérisation des modèles tout au long des tests *in vitro* montre une évolution physico-chimique des supports semblable à celle du minéral osseux. Ce travail permet de préciser les mécanismes mis en jeu lors des traitements utilisant des bisphosphonates et de tester la validité d'études *in vitro* pour le criblage de molécules actives sur le tissu osseux.

Mots-clés : apatites nanocristallines, bisphosphonates, adsorption, ostéoblastes, ostéoclastes, biomimétisme

Bisphosphonates (BPs) are currently administered to treat diseases involving bone disorders such as osteoporosis or Paget's disease. However, the interactions between bisphosphonate molecules and apatite nanocrystals of bone are not well understood. The aim of this work was to study the interactions between one bisphosphonate, tiludronate and nanocrystalline apatites with different compositions as bone mineral models in order to clarify the adsorption and release of BPs on/from bone mineral analogues and to evaluate the effect of such associations on osteoblast and osteoclast cells cultures. Several nanocrystalline apatites (NCA) corresponding to young and mature bone mineral models were synthesized and characterized. The adsorption of tiludronate onto NCA, corresponded to a Langmuir type isotherm. Only a very small fraction of the adsorbed molecules was released in water. The uptake of tiludronate molecules was associated with a linear increase of phosphate ions in the adsorbing solution, indicating that the main reaction was an ion exchange process involving surface anions. The proportion of ions involved in this exchange reaction depended on the nature of the bone mineral models. Based on these results a modification of the adsorption reaction including the ion exchange with phosphate ions was proposed. A model of the adsorption process is proposed, based on the literature and several nanocrystals surface models, suggesting an interaction in two steps: a binding of phosphonates groups with calcium ions on the apatite surface associated with the loss of protons from the adsorbing molecules and the release of surface phosphate ions to maintain some surface charge equilibrium. In order to study the effects of apatite nanocrystals with different compositions and with or without adsorbed tiludronate on cells cultures, apatite pellets were obtained by uniaxial compression. Human osteoprogenitor cells (HOP), human bone marrow stromal cells (HBMSC) and murine osteoclasts were cultured on these apatitic substrates. The results indicated that osteoblasts proliferation was stimulated by adsorbed tiludronate molecules whereas creation of resorption pits by osteoclasts was inhibited. No difference in cell behaviour was noticed on the different bone analogues. Moreover, an evolution of the physico-chemical characteristics of the apatitic substrate during cell culture was observed, highlighting the existence of dynamic interactions possibly similar to bone mineral evolution. This work contributes to clarify the reaction mechanisms between bisphosphonates and biomimetic apatites and to evaluate *in vitro* conditions for drug delivery system.

Keywords: nanocrystalline apatites, bisphosphonates, adsorption, osteoblast, osteoclast, biomimetism